



Université de Sherbrooke

**Étude préclinique de la poudre de pelure de pomme séchée  
comme suppresseur du phénotype malin des gliomes**

Par  
Audrey Pouliot  
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin 2014

Membres du jury d'évaluation :

Dr David Fortin, département de chirurgie, affilié au programme de pharmacologie  
Dr André Cantin, département de médecine, affilié au programme de pharmacologie  
Dre Nathalie Perreault, département d'anatomie et de biologie cellulaire (juge externe)

© Audrey Pouliot, 2014

# RÉSUMÉ

## Étude préclinique de la poudre de pelure de pomme séchée comme supprimeur du phénotype malin des gliomes

Par  
Audrey Pouliot  
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie,  
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,  
Québec, Canada, J1H 5N4

Le glioblastome multiforme est le plus fréquent et le plus agressif des gliomes malins. Suite au diagnostic, la survie médiane des patients est de 12 à 15 mois. Le traitement de première ligne consiste en une chirurgie de résection suivie de chimiothérapie combinée à la radiothérapie. Malgré la combinaison de plusieurs modalités de traitement, la survie des patients n'est prolongée que de quelques mois. Or, plusieurs études ont démontré que les extraits de pelure de pomme peuvent inhiber la prolifération et induire la mort cellulaire de lignées cancéreuses *in vitro*, dont quelques-unes sur des cellules provenant de gliomes malins. Des propriétés anticancéreuses ont été observées *in vivo* sur des tumeurs d'hépatome, de cancer du sein et de mélanome.

Dans ce contexte, il apparaissait intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique de la pelure de pomme dans le cancer cérébral. Nous avons donc conçu une étude en 2 volets: tout d'abord un volet *in vitro* impliquant 3 lignées cellulaires de gliomes de haut grade (F98, U-118 MG et U-87 MG) exposées à 0,1, 0,2 et 0,4 mg/mL de PPPS; puis un volet *in vivo* portant sur des tumeurs développées suite à l'implantation de cellules F98 chez les rats Fischer, qui ont été gavés quotidiennement avec de la PPPS (61,71 mg/kg ou 123,43 mg/kg) ou de l'eau (contrôle) à partir du 10<sup>e</sup> jour post-implantation.

Dans les 3 lignées cellulaires, les traitements de PPPS diminuent de façon significative le métabolisme cellulaire et augmentent la proportion de la population hypodiploïde. En présence de PPPS, la croissance et l'invasion des sphéroïdes de F98 et de U-87 MG sont inhibées. La PPPS diminue de moitié la proportion de cellules F98 en phase S, et fait augmenter dans les U-118 MG les deux marqueurs d'autophagie étudiés, soit p62 et LC3-II. Par contre, aucune différence dans la survie des rats Fischer-F98 n'a été observée entre le groupe contrôle et les groupes traités. La taille des tumeurs ainsi que les marqueurs d'apoptose et d'autophagie ne présentaient pas de différence entre les groupes. Les résultats obtenus ouvrent la voie à l'exploration plus approfondie des mécanismes des effets *in vitro* observés, tout en suggérant d'envisager d'autres voies d'administration de la PPPS *in vivo*.

**Mots clés :** Glioblastome, pelure de pomme, apoptose, autophagie, invasion, cycle cellulaire, imagerie par résonance magnétique, survie.

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé.....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>vii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>Tumeurs cérébrales.....</b>	<b>9</b>
1.1 Types et statistiques .....	9
1.2 Traitements classiques du glioblastome multiforme.....	10
1.3 Caractéristiques du glioblastome multiforme.....	11
1.4 Limitations thérapeutiques.....	11
<b>Pommes et dérivés .....</b>	<b>13</b>
1.5 Composition et ingrédients actifs.....	13
1.6 Pharmacocinétique.....	14
1.7 Effets bénéfiques généraux.....	16
1.8 Effets anticancéreux.....	17
1.9 Études in vitro sur les cellules gliales malignes .....	21
1.10 Études in vivo évaluant le potentiel thérapeutique de la pomme .....	21
1.11 Innocuité .....	23
<b>Hypothèses et objectifs de recherche.....</b>	<b>23</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>25</b>
<b>Volet <i>in vitro</i>.....</b>	<b>25</b>
1.12 Culture de cellules gliales malignes.....	25
1.13 Préparation de la PPPS .....	25
1.14 Essai colorimétrique WST-1 .....	26
1.15 Évaluation de l'invasion 3D.....	27
1.16 Détection de l'apoptose et étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	28
1.17 Extraction protéique .....	29

1.18	Détection de l'apoptose et de l'autophagie par immunobuvardage de type western .....	29
1.19	Analyse statistique.....	31
<b>Volet <i>in vivo</i> .....</b>		<b>31</b>
1.20	Modèle murin Fischer-F98 .....	31
1.21	Technique d'implantation .....	32
1.22	Gavage.....	32
1.23	Suivi de la progression tumorale par IRM et analyse radiologique .....	33
1.24	Technique et critères d'euthanasie.....	34
1.25	Prélèvement, conservation et préparation des spécimens cérébraux.....	34
1.26	Évaluation de la taille des tumeurs par coloration H&E .....	35
1.27	Études immunohistochimiques.....	36
<b>Résultats .....</b>		<b>38</b>
<b>Effets anticancéreux <i>in vitro</i> impliquant plusieurs phénomènes cellulaires .....</b>		<b>38</b>
1.28	Inhibition du métabolisme des lignées F98, U-118 MG et U-87 MG.....	38
1.29	Inhibition de la croissance 3D des sphéroïdes de F98 et de U-87 MG .....	40
1.30	Inhibition de la prolifération cellulaire dans les F98 .....	43
1.31	Augmentation de la population hypodiploïde dans les 3 lignées.....	46
1.32	Augmentation de la caspase-3 clivée dans la lignée U-87 MG .....	48
1.33	Variation des marqueurs d'autophagie dans la lignée U-118 MG.....	49
<b>Absence de différence significative observée dans le modèle <i>in vivo</i>.....</b>		<b>51</b>
1.34	Survie des rats Fischer-F98 .....	51
1.35	Croissance radiologique des tumeurs.....	52
1.36	Taille histologique des tumeurs .....	53
1.37	Immunohistochimie contre PCNA et caspase-3 clivée .....	54
<b>Discussion .....</b>		<b>56</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>		<b>71</b>
<b>Remerciements .....</b>		<b>74</b>
<b>Liste des références.....</b>		<b>75</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Réaction de transformation mitochondriale du WST-1 en sel de formazan .....	26
<b>Figure 2</b> : Coordonnées et technique d'implantation.....	32
<b>Figure 3</b> : Inhibition du métabolisme cellulaire par la PPPS dans les 3 lignées .....	39
<b>Figure 4</b> : Inhibition de la croissance et de l'invasion 3D des sphéroïdes F98 .....	41
<b>Figure 5</b> : Inhibition de la croissance et de l'invasion 3D des sphéroïdes U-87 MG.....	42
<b>Figure 6</b> : Graphiques typiques obtenus par le logiciel CellQuest lors de l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux .....	43
<b>Figure 7</b> : Diminution de la proportion des cellules en phase S chez les cellules F98 .....	45
<b>Figure 8</b> : Augmentation de la proportion des cellules hypodiploïdes dans les 3 lignées ...	47
<b>Figure 9</b> : Effet d'un traitement de 24h à la PPPS sur le clivage de la caspase-3 dans les cellules U-87 MG.....	48
<b>Figure 10</b> : Effet d'un traitement de 24h à la PPPS sur l'expression des protéines p62 et LC3 dans les cellules U-118 MG.....	50
<b>Figure 11</b> : Diagramme de Kaplan-Meier du modèle Fischer-F98.....	51
<b>Figure 12</b> : Suivi de la croissance tumorale par IRM (pondération T1). .....	53
<b>Figure 13</b> : Taille tumorale évaluée par coloration H&E des cerveaux prélevés .....	54
<b>Figure 14</b> : Colorations immunohistochimiques contre les marqueurs PCNA et caspase-3 clivée.....	55

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Résumé des effets observés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses dans la littérature actuelle.....	17
<b>Tableau 2 :</b> Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type western.....	30

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

3D	Tridimensionnel(le)
$\lambda$	Longueur d'onde
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrdU	5-Bromodésoxyuridine
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumine sérique bovine)
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GBM	Glioblastome multiforme (astrocytome de grade IV)
H&E	Hématoxyline et éosine
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (peroxydase de raifort)
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LC3	Protéine <i>light chain 3</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MMP	Métalloprotéinase de la matrice
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
O/N	<i>Overnight</i> (durant toute une nuit)
PI	Iodure de propidium
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampon phosphate salin)
PBT	PBS-BSA-Triton X-100
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PPPS	Poudre de pelure de pomme séchée



px	Pixels
RNAse	Ribonucléase
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2</i>
WST	<i>Water Soluble Tetrazolium Salt</i>

# INTRODUCTION

## Tumeurs cérébrales

### 1.1 Types et statistiques

Selon les statistiques de la Société canadienne du cancer, 2 800 Canadiens, dont 780 Québécois, ont reçu un diagnostic de cancer de l'encéphale au cours de l'année 2012 (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2012). Bien que les cancers du système nerveux central (SNC) soient dix fois moins fréquents que le cancer du poumon, ils se placent au 10<sup>e</sup> rang dans les causes de décès par cancer au Canada. Ces tumeurs se divisent en deux principales catégories : la première correspond aux néoplasies se développant à même le SNC, qui sont qualifiées de tumeurs *primaires*. L'autre classe, que l'on appelle couramment *métastases*, réfère aux tumeurs issues de la migration au SNC de cellules cancéreuses initialement présentes ailleurs dans l'organisme.

La classification de l'Organisation mondiale de la santé, rééditée en 2007, dénombre plus de 130 types de tumeurs cérébrales primaires (Louis *et al.*, 2007). Parmi les tumeurs issues du parenchyme cérébral, les plus fréquentes sont certainement les gliomes, qui regroupent les astrocytomes, les épendymomes et les oligodendrogliomes (Dolecek *et al.*, 2012). Dans le cadre de ce projet de recherche, les astrocytomes seront discutés plus en détail. Ils se divisent en quatre grades histologiques, qui sont à la base de l'approche thérapeutique et du pronostic. Le grade I, qui englobe l'astrocytome pilocytique et l'astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes, réfère aux tumeurs bénignes (non cancéreuses). Il atteint le plus souvent la population pédiatrique, et est curable par chirurgie. Le grade II désigne l'astrocytome diffus, dont la différenciation préservée le classe parmi les tumeurs malignes de bas grade. Finalement, les grades III (astrocytome anaplasique) et IV (glioblastome, glioblastome à cellules géantes et gliosarcome) sont souvent identifiés comme étant les gliomes de haut grade (Louis *et al.*, 2007; Ricard *et al.*, 2012).

Le glioblastome, aussi appelé glioblastome multiforme (GBM), représente 52% des gliomes en terme d'incidence (Dolecek *et al.*, 2012). Cette tumeur, qui a la réputation d'être la plus agressive des tumeurs cérébrales, peut survenir à la suite de la transformation d'un astrocytome de grades II ou III; on qualifie alors le GBM de secondaire (Wen et Kesari, 2008; Ricard *et al.*, 2012). Les GBM peuvent également apparaître *de novo*; il s'agit alors de GBM primaires. Bien que ces deux entités se distinguent l'une de l'autre par des différences moléculaires, biologiques et épidémiologiques, elles ont en commun une survie médiane de 12 à 15 mois (Wen et Kesari, 2008).

## ***1.2 Traitements classiques du glioblastome multiforme***

Dû aux caractéristiques énoncées ci-haut et aux défis thérapeutiques discutés ci-après, la prise en charge des GBM requiert l'association de plusieurs modalités de traitement. Une chirurgie de résection est tout d'abord pratiquée, lorsque la tumeur s'avère opérable de par sa localisation et son étendue (Stummer *et al.*, 2011). Puis, une combinaison de chimio- et radiothérapie fractionnée, suivie de chimiothérapie adjuvante, complète l'actuel traitement de première ligne (Stupp *et al.*, 2005). L'agent chimiothérapeutique de choix pour les gliomes malins est le temozolomide (Temodal<sup>®</sup>). Il s'agit d'une molécule administrée *per os*, qui est rapidement et spontanément convertie en son métabolite actif, le méthyltriazen-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC). Plusieurs autres agents ont été étudiés, notamment la carmustine, la lomustine, la procarbazine et la vincristine, sans toutefois avoir un impact sur la survie des patients (See et Gilbert, 2007).

Or, la prise en charge agressive et multimodale permet d'augmenter la survie médiane de 12,1 (chirurgie et radiothérapie) à 14,6 mois, selon une importante étude randomisée multicentrique (Stupp *et al.*, 2005). Elle augmente également le taux de survie à 2 ans de 10,4% à 26,5%. Malgré ces résultats marquants, l'amélioration du pronostic des patients atteints de GBM demeure très modeste. En fait, malgré tous les efforts en recherche dans ce domaine, très peu de progrès ont été réalisés au cours des 30 dernières années, et les GBM demeurent à ce jour incurables.

### **1.3 Caractéristiques du glioblastome multiforme**

Comme son nom l'indique, le GBM est reconnu pour son hétérogénéité. Malgré cela, certaines particularités, autant macroscopiques que microscopiques, le caractérisent. À l'instar de la majorité des cancers, les cellules de GBM prolifèrent de manière incontrôlée et très rapide (Wen et Kesari, 2008). De plus, les cellules malignes s'infiltrant typiquement sur plusieurs centimètres dans le parenchyme sain (DeAngelis, 2001), rendant ainsi la résection totale quasi-impossible. La néoangiogenèse, quoique désorganisée, est souvent stimulée de manière soutenue (Ricard *et al.*, 2012). Une zone nécrotique se forme souvent au centre de la tumeur, donnant une apparence annulaire caractéristique à l'imagerie (DeAngelis, 2001).

D'un point de vue cellulaire, les GBM primaires et secondaires présentent typiquement des mutations distinctes (Wen et Kesari, 2008; Ricard *et al.*, 2012). Toutefois certains facteurs de transcription et voies de signalisation sont classiquement identifiés comme étant à l'origine des caractéristiques des GBM. Par exemple, la mutation de la protéine p53 et la méthylation du promoteur du gène MGMT sont retrouvés dans les GBM (Ricard *et al.*, 2012). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est souvent activé de manière constitutive dans les GBM (Nogueira *et al.*, 2011). Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est reconnu pour être amplifié, surexprimé et muté (EGFRvIII) dans bon nombre de GBM (Hegi *et al.*, 2012). Plusieurs autres molécules et voies ont été identifiées, mais elles ne seront pas discutées dans le présent travail.

Globalement, les multiples anomalies géniques et cellulaires confèrent aux GBM leur caractère agressif et leur mauvais pronostic. Le haut taux d'échec aux traitements actuels et de récurrence des GBM témoigne des défis thérapeutiques discutés ci-après.

### **1.4 Limitations thérapeutiques**

Plusieurs raisons expliquent le peu de succès des différentes modalités thérapeutiques. Tout d'abord, tel que mentionné précédemment, les GBM sont des tumeurs hautement infiltratives, ce qui rend impossible une résection oncologiquement complète. De plus, la

localisation de la tumeur par rapport à certaines régions critiques du cerveau, comme les aires éloquentes, peut restreindre voire empêcher la résection chirurgicale de la tumeur.

De plus, la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui filtre la quasi-totalité des substances xénobiotiques pouvant atteindre le parenchyme cérébral, complique l'acheminement des traitements de chimiothérapie aux cellules tumorales (Pardridge, 2002). Bien que la BHE soit partiellement ébréchée en présence d'un GBM (Schneider *et al.*, 2004), la dose parvenant au cerveau s'avère souvent insuffisante, d'autant plus que les cellules ayant infiltré le parenchyme sont hors de portée (Muldoon *et al.*, 2007). De plus, la présence de pompes à efflux au sein de la BHE diminue encore davantage l'accès des molécules chimiothérapeutiques à leur cible, puisque beaucoup de molécules ayant traversé la BHE sont rejetées vers la lumière vasculaire (Ueno *et al.*, 2010). Par ailleurs, lorsqu'elles sont exposées à la chimiothérapie, il est bien connu que les cellules de GBM peuvent développer de la chimiorésistance par différents mécanismes (DeAngelis, 2001; Wen et Kesari, 2008).

Finalement, la radiothérapie présente elle aussi plusieurs limitations. D'une part, elle est limitée par la faible tolérance du parenchyme cérébral aux radiations (Rogers, 2012). D'autre part, les cellules gliales malignes peuvent développer une radiorésistance, notamment via l'activation préférentielle des voies de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Wen et Kesari, 2008).

En résumé, le GBM est la plus fréquente et, malheureusement, la plus agressive des tumeurs cérébrales. Malgré la combinaison de différentes modalités de traitement, son pronostic demeure très sombre. L'exploration d'autres avenues thérapeutiques est donc essentielle.

## **Pommes et dérivés**

### ***1.5 Composition et ingrédients actifs***

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'identifier les différentes composantes de la pomme. Bien que la composition exacte puisse varier selon certains facteurs, tels que le cultivar, le lieu et les conditions de production (Ju *et al.*, 1996; Boyer et Liu, 2004; McGhie *et al.*, 2005), il est reconnu que les pommes constituent une riche source de polyphénols. D'ailleurs, la pomme se classe au 2<sup>e</sup> rang des fruits les plus fréquemment consommés en terme de teneur en composés phénoliques (Sun *et al.*, 2002).

Les composés les plus souvent retrouvés dans la pomme sont les procyanidines, la catéchine, l'épicatéchine, la phloridzine, les anthocyanidines et les conjugués de quercétine (Boyer et Liu, 2004; Gerhauser, 2008). Les anthocyanidines étant un pigment donnant la couleur à la pelure, ils sont surtout retrouvés dans les pommes rouges (Gerhauser, 2008). En plus des polyphénols mentionnés ci-haut (Béliveau et Gingras, 2005), la pomme renferme d'autres composés phytochimiques, tels que les triterpénoïdes, dont le plus connu est l'acide ursolique contenu dans la cire épicuticulaire de la pomme (Gerhauser, 2008).

Il est important de préciser que quelques composés se retrouvent majoritairement dans une certaine partie de la pomme. C'est le cas notamment des conjugués de la quercétine, des anthocyanidines (Ju *et al.*, 1996; Boyer et Liu, 2004) et, dans une moindre mesure, de la catéchine (Escarpa et González, 1998), qui sont concentrés dans la pelure. L'acide chlorogénique, quant à lui, est retrouvé presque exclusivement dans la chair de la pomme (Escarpa et González, 1998; Boyer et Liu, 2004).

Il a par ailleurs déjà été démontré que la pelure possède des propriétés bien différentes des autres parties de la pomme, particulièrement de la chair (Ju *et al.*, 1996; Escarpa et González, 1998; Wolfe *et al.*, 2003). L'étude réalisée en 2003 par Wolfe *et al.* l'a démontré de façon éloquent, en comparant le contenu en polyphénols, le potentiel antioxydant et l'activité antiproliférative sur des cellules de carcinome hépatocellulaire HepG<sub>2</sub> de trois extraits de pommes : la pelure, la chair et une combinaison des deux. Dans les quatre

cultivars étudiés, la pelure s'est avérée être de loin l'extrait ayant le plus grand potentiel bioactif.

Bien qu'il soit souvent de mise de n'étudier qu'une seule molécule à la fois en chimie médicinale et en pharmacologie, les résultats publiés en 2006 par le groupe de Veeriah *et al.* suggèrent que la pelure de pomme soit utilisée dans son intégralité. En effet, dans l'extrait préparé à partir de pommes fraîches, huit flavonoïdes ont été identifiés comme étant les principaux composants. Ces huit molécules ont ensuite été testées de façon individuelle ou combinée (en concentration équivalente à l'extrait initial) et comparées à l'extrait intégral en terme de capacité à inhiber la prolifération des cellules de cancer colique HT29 et à moduler l'expression de gènes pro-carcinogènes. Or, les effets anticancéreux de l'extrait complet étaient nettement supérieurs à ceux du mélange synthétique des huit flavonoïdes, qui était lui-même plus puissant que la somme des effets des 8 composés testés individuellement. Ces résultats suggèrent donc que d'une part, des molécules non identifiées possèdent des propriétés bioactives, et que d'autre part il existe une synergie entre les composés. Des observations similaires ont été soulignées dans un autre article (Kern *et al.*, 2005). Par conséquent, nombreux sont les groupes de recherche qui étudient la pelure de pomme dans son intégralité (Eberhardt *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2007; Reagan-Shaw *et al.*, 2010).

## **1.6 Pharmacocinétique**

Tel que mentionné précédemment, le traitement des GBM comporte de multiples défis, particulièrement en ce qui a trait à l'acheminement des molécules actives au sein de la tumeur. La pharmacocinétique devient alors particulièrement importante. Or, dans le cas de la pelure de pomme, le fait d'étudier un ensemble de composés complique grandement la recherche des paramètres pharmacocinétiques, d'autant plus lorsque plusieurs de ces composés demeurent inconnus.

Certains groupes ont donc tenté de déterminer la biodisponibilité de certaines molécules de manière isolée. Tout d'abord, une étude qui impliquait des patients présentant une

iléostomie a démontré que plusieurs composantes du jus de pomme étaient absorbées en des proportions appréciables, notamment les acides hydroxycinnamique et chlorogénique (Kahle *et al.*, 2007). L'absorption des procyanidines oligomériques chez les rats semble également intéressante (Shoji *et al.*, 2006), tout comme celle des anthocyanidines (Walle, 2004). Suite à l'administration par voie orale de polyphénols de pomme à des rats, plusieurs de ces polyphénols ont été dosés dans le sérum prélevé 1 à 3h après l'ingestion du traitement, suggérant ainsi leur absorption (Miura *et al.*, 2007). Chez l'humain, les polyphénols les mieux absorbés semblent être (dans l'ordre) l'acide gallique, les isoflavones, la catéchine, les flavanones (flavonoïdes) et les conjugués de la quercétine (Manach *et al.*, 2005). Les proanthocyanidines et les anthocyanidines semblent être absorbés dans une moindre mesure. La cinétique d'absorption varie également entre les polyphénols, la concentration maximale étant atteinte après 1,5 et 5,5h (Manach *et al.*, 2005).

Par contre, il faut aussi considérer le fait qu'une fraction non négligeable des conjugués de flavonoïdes soit rejetée vers la lumière intestinale par des pompes à efflux telle la *multidrug resistance-associated protein 2* (Walle, 2004).

Outre dans les entérocytes, les polyphénols peuvent être métabolisés à plusieurs autres niveaux. La flore bactérienne intestinale hydrolyse plusieurs polyphénols, permettant ainsi leur absorption (Barnes *et al.*, 2011). Le foie est un site de transformation majeur, particulièrement pour les molécules administrées *per os*. Selon leur nature, les composés phytochimiques y subissent des réactions de phase I (via le cytochrome P450) et/ou de phase II. Un autre site de transformation des polyphénols se situe au sein de la BHE, du moins *in vitro*, tel que le suggèrent les résultats de Faria *et al.* de 2011. En outre, non seulement l'étendue et la nature des transformations biochimiques sont difficilement évaluables, mais on ignore toujours si elles activent ou inactivent les composés absorbés.

Finalement, la capacité des constituants de la pelure de pomme à traverser la BHE est quant à elle peu connue. Cependant, une étude a démontré que les anthocyanidines pouvaient s'accumuler dans certains organes, incluant le parenchyme cérébral (Kalt *et al.*, 2008), chez



les cochons nourris avec des bleuets. Lorsque reproduite *in vitro*, la BHE semble également être perméable à l'épicatéchine et à la catéchine (Faria *et al.*, 2011).

En somme, bien que les paramètres pharmacocinétiques soient difficilement évaluable dans le contexte de la multitude des composantes de la pelure de pomme et de l'identification que partielle de ceux-ci, il semble qu'au moins une partie des molécules puisse atteindre le parenchyme cérébral. De plus, les effets bénéfiques sur la santé déjà décrits dans la littérature suggèrent une biodisponibilité généralement suffisante.

### ***1.7 Effets bénéfiques généraux***

Comme l'indique le vieil adage "Une pomme par jour éloigne le médecin pour toujours", la pomme est depuis longtemps reconnue pour ses effets bénéfiques sur la santé. Nombreuses sont les études qui se sont penchées sur les propriétés prophylactiques de la pomme. Aussi, l'utilisation de la pomme comme traitement de diverses pathologies est de plus en plus étudiée, particulièrement pour les maladies chroniques.

Il a notamment été démontré que les flavonoïdes des pommes réduisaient les risques de développer des maladies cardiovasculaires, de l'asthme, et du diabète de type II (Boyer et Liu, 2004; Hyson, 2011). La consommation de pommes semble également favoriser la perte de poids, en plus d'améliorer les fonctions cognitives et de diminuer les risques de souffrir d'Alzheimer (Hyson, 2011). Fait intéressant, une étude de cohortes finlandaise comportant 10 054 participants a démontré que les personnes qui consommaient davantage de flavonoïdes avaient un taux de mortalité (de toute cause) plus bas (Knekt *et al.*, 2002). Or, puisque la pomme constitue une des principales sources de flavonoïdes alimentaires en Finlande (Boyer et Liu, 2004), il pourrait être raisonnable de croire qu'une partie de cet effet puisse être expliquée par la consommation de pommes. Une étude italienne de type cas-témoins, qui comptait plus de 7 000 participants, a également démontré une association inverse entre la consommation de pommes et le développement de différents types de cancers (Gallus *et al.*, 2005).

Plusieurs hypothèses relatives aux mécanismes pouvant expliquer les multiples effets observés ont été émises. Beaucoup de ces hypothèses sont en lien avec le potentiel antioxydant des polyphénols, selon la prémisse que la majorité des pathologies chroniques décrites précédemment et des cancers surviennent dans un environnement hautement oxydatif (Boyer et Liu, 2004). Il est aussi proposé que les propriétés observées soient dues à la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire.

### 1.8 Effets anticancéreux

Plusieurs des molécules contenues dans la pelure de pomme ont démontré des effets intéressants, tant sur des cellules *in vitro* que sur des animaux. Le Tableau 1 présente un résumé des nombreuses études qui ont démontré que différentes lignées cellulaires cancéreuses étaient sensibles à la pomme et/ou à ses composantes.

**Tableau 1 : Résumé des effets observés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses dans la littérature actuelle.**

Types de cancer	Lignées cellulaires	Effets observés	Études
Foie	AH109A	↓ prolifération ; ↓ invasion	(Miura <i>et al.</i> , 2007)
	HepG <sub>2</sub>	↓ prolifération	(Wolfe <i>et al.</i> , 2003)
		↓ prolifération	(Eberhardt <i>et al.</i> , 2000)
Côlon	HT-29	↓ survie	(Veeriah <i>et al.</i> , 2007; Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
		↓ survie ; ↓ colonies formées	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
		↓ prolifération ; inhibition EGFR*	(Kern <i>et al.</i> , 2005)
		↓ Liaison à TLR4**; ↓ translocation de TLR4**; ↑ expression de Iκ-Bα/p65	(Zhang <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2013)
	SW620	↑ apoptose via ↑ sensibilité au TRAIL***	(Maldonado-Celis <i>et al.</i> , 2009)
		↓ Ras	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
		↑ G2/M, ↑ apoptose	(Gossé <i>et al.</i> , 2005)
		↓ Liaison à TLR4**; ↓ translocation de TLR4**; ↑ expression de Iκ-Bα/p65	(Zhang <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2013)

	HCT-15	↓ survie	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
	Caco-2	↓ survie ; ↑ S ; ↓ formation des colonies ; ↓ migration	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
		↓ prolifération	(Eberhardt <i>et al.</i> , 2000)
	HCT-116	↓ survie	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
	HKE-3	↓ survie	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
	DLD-1	↓ survie ; ↓ formation des colonies ; ↑ S ; ↑ G2 ; ↓ G1 ; ↓ Ras ; ↓ migration	(Psahoulia <i>et al.</i> , 2007)
Sein	BALB-MC.E12	↓ métabolisme ; ↓ prolifération ; ↑ apoptose	(Miura <i>et al.</i> , 2008)
	Mcf-7	↓ survie ; ↓ prolifération ; ↑ G0/G1	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
		↓ prolifération ; ↑ G1	(Sun et Liu, 2008)
		↓ survie ; ↓ prolifération	(Yoon et Liu, 2007)
	MDA-MB-231	↓ prolifération ; ↑ ratio G1/S	(Sun et Liu, 2008)
	NCI-ADR	↓ survie	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
	MDA-MB-468	↓ survie	(Thompson <i>et al.</i> , 2009)
	MCF10A	↑ p53/Bax; ↑ activité de JNK, p38 et caspase-3	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
Mélanome	B16	↓ prolifération	(Miura <i>et al.</i> , 2008)
Prostate	DU145	↓ survie ; ↓ prolifération ; ↑ G0/G1	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
Ovaire	SK-OV-3	↓ survie	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
Poumon	NCI-H460	↓ survie	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
Leucémie	HL-60	↓ survie	(Reagan-Shaw <i>et al.</i> , 2010)
	CEM	↑ G1	(Yoshida <i>et al.</i> , 1992)
Œsophage	OE-33	↓ survie ; ↑ apoptose ; ↑ G0/G1	(Pierini <i>et al.</i> , 2008)
	OE-19	↓ survie ; ↑ apoptose ; ↑ G0/G1	(Pierini <i>et al.</i> , 2008)
Glandes salivaires	ACC-M	↑ apoptose ; ↑ G0/G1 ; ↓ VEGFR-2****	(Zheng <i>et al.</i> , 2013)

\* EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

\*\* TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

\*\*\*TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

\*\*\*\* VEGFR-2 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2*

**Note** : les termes G0, G1, S, G2 et M correspondent à la proportion cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Pour expliquer ces observations, plusieurs mécanismes ont été proposés. Plusieurs études ont démontré l'implication des caspases dans les processus de mort cellulaire. Selon certains articles, la voie intrinsèque serait activée par des extraits de pomme (Miura *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013) et par la quercétine (Braganhhol *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013). Ces conclusions se basent surtout sur l'activation des caspases-3, 7 et 9, sur la relâche de cytochrome c dans le cytosol et sur la perte du potentiel membranaire mitochondrial. À l'inverse, une étude suggère que l'induction d'apoptose se fait via la voie extrinsèque, tel que vu par l'activation de TRAIL et de la caspase-8 (Maldonado-Celis *et al.*, 2009). Deux autres articles soulignent que la quercétine (Kim *et al.*, 2008) et les polyphénols de la pomme (Gossé *et al.*, 2005) peuvent avoir un effet sur la voie ERK/Akt, mais leurs observations divergent.

Outre la quercétine, la phloridzine et son métabolite, appelé phlorétine, sont aussi fréquemment identifiés comme ayant des propriétés particulièrement intéressantes. Il a notamment été démontré que la phlorétine peut induire l'apoptose de cellules de cancer du sein en augmentation les concentrations des protéines p53 et Bax, promouvant ainsi l'activité de caspase-3, JNK et p38 (Kim *et al.*, 2009).

L'autophagie, qui peut être à la fois salvatrice ou fatale pour une cellule, semble être induite par la quercétine dans les cellules de cancer du côlon (Psahoulia *et al.*, 2007). Toutefois, aucune différence sur ce processus n'a été observée sur des cellules de GBM (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013).

Un arrêt du cycle cellulaire a été observé à de multiples reprises suite à un traitement à base de pomme. Bien que la phase de cet arrêt diffère entre les études, plusieurs s'entendent pour dire que la prolifération cellulaire est grandement diminuée. Récemment, il a été démontré que des dérivés de la pomme pouvaient induire un arrêt du cycle en phase de réplication, suite à une diminution de l'expression de la cycline B1 et de la *cyclin-dependent kinase* (CDK)-2 (Li *et al.*, 2013).

Une autre hypothèse émise par le groupe de Yoon *et al.* en 2008 consiste en l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par inhibition du protéasome. Dans le même ordre d'idée, deux études dirigées par Mei en 2013 ont démontré que dans les cellules HT-29 et SW620, les polysaccharides extraits de la pomme pouvaient inhiber la voie TLR4/NF- $\kappa$ B (Li *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Cet effet serait dû à la diminution de la capacité de liaison au récepteur TLR4 et de la translocation nucléaire de ce dernier, ainsi qu'à l'accumulation des inhibiteurs I $\kappa$ -B $\alpha$  et p65. Or, NF- $\kappa$ B joue un rôle-clé dans l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la carcinogenèse, telles que la cycline D1, les métalloprotéinases de la matrice (MMP), le VEGF, la COX-2, le Bcl-2 et le Bcl-xL (Aggarwal et Shishodia, 2006). NF- $\kappa$ B régule également la transcription du promoteur oncogène c-Myc (La Rosa *et al.*, 1994) et de Mdm-2, un inhibiteur de p53 (Tergaonkar *et al.*, 2002). Vu le rôle central de NF- $\kappa$ B dans bon nombre de processus cellulaires, cette hypothèse pourrait expliquer la multitude des effets observés. D'ailleurs, l'inhibition de la COX-2 et de la MMP-9 a été observée dans les cellules U-87 MG exposées à la quercétine.

La maspine, qui fait partie de la grande famille des suppresseurs de tumeur, a également été identifiée comme étant influencée par les composés de la pomme (Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Sa capacité à inhiber l'invasion cellulaire, la migration métastatique et l'angiogenèse fait d'elle une cible pharmacologique intéressante. Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que les conjugués de quercétine pouvait substantiellement inhiber EGFR. Ce récepteur étant surexprimé dans près de la moitié des GBM et constitutivement activé chez environ 30% des patients, en plus d'être impliqué dans plusieurs voies en lien avec la survie et la prolifération cellulaire, il serait une autre cible très prometteuse (Hegi *et al.*, 2012).

En somme, les mécanismes d'action de la pomme et de ses dérivés décrits à ce jour sont nombreux et complexes, et il y a fort à parier que de nombreux autres seront identifiés dans les prochaines années.

### **1.9 Études *in vitro* sur les cellules gliales malignes**

Les études *in vitro* portant sur les effets de la pomme et de ses dérivés, dont quelques-unes ont été présentées ci-haut, sont multiples. Les articles portant sur des cellules de cancer cérébral sont toutefois beaucoup moins nombreux. Parmi ceux-ci, un seul article a évalué les effets de la pelure sous sa forme intégrale (Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Dans cette étude, des cellules de GBM (SF-268), ainsi que plusieurs autres lignées cellulaires cancéreuses, ont été exposées à un extrait de pelure de pomme solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 1%. Après un traitement de 72h à des concentrations de 2,5 ou de 5%, trois différents tests de cytotoxicité ont été effectués. L'extrait de 5% a significativement inhibé l'activité de la calcium estérase, le potentiel mitochondrial membranaire et le contenu en ATP. À la concentration de 2,5% de pelure de pomme, la diminution du contenu en ATP était également significative. Il est à noter que l'extrait de pelure de pomme a aussi démontré des propriétés cytotoxiques sur les huit autres lignées cancéreuses testées dans cette étude.

Les autres études *in vitro* en lien avec des cellules gliales malignes se sont concentrées sur les effets plus spécifiques de la quercétine. Il a été observé que la quercétine réduisait la viabilité des cellules A172 (Kim *et al.*, 2008), U138MG (Braganhhol *et al.*, 2006) et T98G (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013), et ce, principalement par apoptose. Elle ne semble pas avoir d'impact sur l'autophagie (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013). Un arrêt du cycle cellulaire en G2 survient chez les cellules U138MG traitées avec la quercétine (Braganhhol *et al.*, 2006). Finalement, la migration et l'invasion des cellules U-87 MG semble être inhibées par la quercétine, via une diminution de l'activité de la cyclo-oxygénase (COX) 2 et de la MMP-9 (Chiu *et al.*, 2010).

### **1.10 Études *in vivo* évaluant le potentiel thérapeutique de la pomme**

Aucune étude *in vivo* n'a étudié le potentiel thérapeutique de la pomme ni sur le GBM, ni sur les gliomes malins. Par contre, deux études *in vivo* ont analysé les effets d'extraits de pomme sur d'autres types de cancer. Ces deux études se distinguent des autres études

*in vivo* par le fait que les animaux ont été traités avec les extraits de pommes après l'implantation des cellules tumorales; le but n'est donc pas préventif, mais bien thérapeutique. Dans la première étude, des rats Donryu implantés en sous-cutané avec des cellules d'hépatomes (AH109A) ont été nourris soit avec une diète régulière, soit avec une diète supplémentée avec un extrait de polyphénols de pomme (Miura *et al.*, 2007). La taille des tumeurs était mesurée quotidiennement en trois dimensions. Les rats des deux groupes ont été euthanasiés après 21 jours de traitement. Puis la tumeur, le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques inguinaux et axillaires étaient prélevés, pour l'analyse de la croissance tumorale et pour la recherche de métastases à distance. La progression et la migration des cellules AH109A étaient significativement diminuées chez les rats traités *per os* avec les polyphénols de pomme comparativement au groupe contrôle.

Dans la seconde étude, des souris C57BL/6 et BALB/c ont été respectivement injectées en sous-cutané avec des cellules de mélanome (B16) et de carcinome mammaire (BALB-MC.E12) (Miura *et al.*, 2008). Les deux extraits de pommes, soit l'extrait de polyphénols et celui de procyanidines, ont été préparés à partir de pomme fraîches et données à boire *ad libitum* aux groupes traités suite à l'implantation. Les groupes contrôles, quant à eux, n'avait accès qu'à de l'eau distillée. Après 14 jours de traitement et de mesure quotidienne des dimensions de la tumeur, les souris étaient euthanasiées. Les tumeurs étaient conservées pour détecter l'apoptose par la méthode TUNEL. Or, les deux types de tumeurs ont présenté une croissance moindre dans les groupes traités respectivement avec les procyanidines (dans le modèle de mélanome) et avec les polyphénols (dans le modèle de carcinome mammaire). Autre résultat intéressant, le taux de survie des souris implantées avec les cellules B16 était significativement augmenté. Finalement, les cellules apoptotiques détectées par TUNEL étaient beaucoup plus nombreuses sur les coupes des souris traitées avec les procyanidines.

En somme, bien que les études *in vivo* portant sur le potentiel curatif ou thérapeutique de dérivés de la pomme soient peu nombreuses, les résultats obtenus sont très prometteurs.

### **1.11 Innocuité**

À la vue des nombreux mécanismes et effets induits par la pomme et ses dérivés, certains pourraient s'inquiéter de la toxicité de ces composés sur les cellules saines. Une étude de toxicologie a d'ailleurs été réalisée sur un extrait de polyphénols de pomme vendu commercialement au Japon (Shoji *et al.*, 2004). Suite à l'exposition de rats sains au produit, des tests de mutagénicité, ainsi que de toxicité aiguë et sub-chronique (90 jours) ont été effectués. Les auteurs ont conclu que l'extrait testé était sécuritaire et non toxique. Aussi, bien que le but de l'étude de Miura *et al.* de 2008 n'était pas d'évaluer l'innocuité de l'extrait de pomme, le fait que la survie soit plus élevée chez les souris traitées suggère que le traitement n'est pas toxique.

Deux études *in vitro* ont exposées des cellules non cancéreuses à leur extrait de pelure de pomme. Les polyphénols de pomme utilisés par Zheng *et al.* en 2013, en concentration inférieure à 250 µg/mL, n'ont engendré aucune toxicité sur les cellules MRC-5, provenant de tissu pulmonaire sain. En outre, le traitement des cellules organotypiques d'hippocampe avec la quercétine semblent apporter une certaine cytoprotection contre la déprivation d'oxygène et de glucose représentant un modèle d'ischémie (Braganhol *et al.*, 2006).

Il faut dire que très peu d'études *in vitro* incluent des contrôles de cellules saines dans leurs expérimentations, car de telles cellules sont souvent difficiles à cultiver étant donné leur nombre de divisions cellulaires limité (Alberts *et al.*, 2002).

### **Hypothèses et objectifs de recherche**

Étant donné le peu d'amélioration du pronostic des patients atteints de GBM au cours des dernières décennies, la recherche de nouveaux traitements, voire moins conventionnels, nous paraît pertinente. Plusieurs études précliniques *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les produits dérivés ou extraits de la pomme pourraient s'avérer efficaces dans le traitement de certains cancers. Or, plusieurs agents chimiothérapeutiques sont extraits de la nature. C'est le cas notamment des alcaloïdes de la pervenche (*vinca alkaloids*), de la doxorubicine et de



l'irinotecan et du paclitaxel. Dans ce contexte, l'exploration des effets antinéoplasiques de la pomme nous semblait particulièrement intéressante.

La revue de littérature a orienté notre choix vers la pelure de pomme, sous sa forme intégrale (Veeriah *et al.*, 2006). Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé de la pelure de pomme sous forme de poudre, déjà préparée et uniforme. L'étude que nous avons élaborée visait dans un premier temps à explorer les effets de la poudre de pelure de pomme séchée (PPPS) sur les grandes caractéristiques des gliomes malins, à savoir l'index de prolifération élevé, l'invasion, la résistance à l'apoptose et le recours à l'autophagie pour stratégie de survie. Ainsi, cette étude exploratoire pourrait ouvrir la porte à des projets visant, dans un deuxième temps, à identifier les voies de signalisation impliquées dans les éventuels effets observés. Les objectifs de notre étude, séparés en 2 volets, étaient les suivants :

- A. Évaluer les effets *in vitro* de la PPPS sur 3 lignées de gliomes de haut grade, d'origine murine (F98) et humaine (U-118 MG et U-87 MG), plus particulièrement sur :
  - ♦ le métabolisme cellulaire,
  - ♦ le cycle cellulaire et la prolifération,
  - ♦ l'invasion tridimensionnelle,
  - ♦ l'apoptose et l'autophagie.
  
- B. Évaluer ses effets *in vivo* sur les tumeurs implantées dans le modèle de rats Fischer-F98, notamment au niveau de :
  - ♦ la survie des animaux,
  - ♦ la progression tumorale,
  - ♦ l'apoptose.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **Volet *in vitro***

#### ***1.12 Culture de cellules gliales malignes***

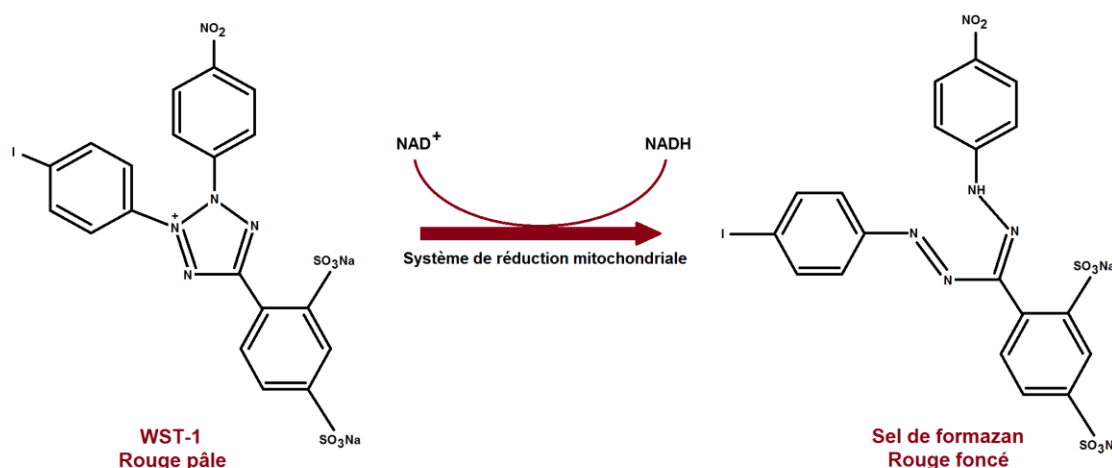
La lignée cellulaire de gliome malin indifférencié d'origine murine F98, de même que les lignées de glioblastome humain U-118 MG et U-87 MG ont été obtenues chez *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, États-Unis). Les cellules F98 et U-118 MG ont été maintenues dans du milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) supplémenté avec 10% de *fetal bovine serum* (FBS), de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) provenant de la compagnie Wisent Bioproducts (St-Jean-de-Baptiste, Québec, Canada). Les cellules U-87 MG ont été cultivées dans du *Eagle's Minimal Essential Medium* (EMEM) supplémenté avec 10% FBS, de la pénicilline (100 UI/mL), de la streptomycine (100 µg/mL), du pyruvate de sodium (1 mM) et des acides aminés non essentiels (1 mM) provenant aussi de Wisent Bioproducts. Les cellules ont été cultivées à 37°C, dans un environnement humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ***1.13 Préparation de la PPPS***

La poudre de pelure de pomme séchée (PPPS) de marque AppleBoost™ (Churubusco, NY, États-Unis) a été généreusement fournie par les Vergers Leahy Inc. (Franklin Centre, Québec, Canada). Tous les tests *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés avec le lot 9132P04-92L. Pour les traitements *in vitro*, une solution-mère a été préparée en solubilisant la PPPS dans du DMSO (Fisher Scientific) pour une concentration finale de 250 mg/mL. Cette solution a ensuite été soniquée à intensité maximale (10) durant 10 min, puis filtrée par gravité avec un filtre Whatman grade 1 (11 µm, VWR). La solution-mère a été conservée à 4°C et jetée tous les 3 mois. Les traitements cellulaires ont été réalisés en diluant la solution-mère de PPPS directement dans le milieu de culture complété, pour des concentrations de PPPS de 0,1, 0,2 et 0,4 mg/mL. Dans tous les cas, la concentration finale du DMSO était ≤ 0,16%.

### 1.14 Essai colorimétrique WST-1

La transformation cellulaire du *Water Soluble Tetrazolium Salt* (WST)-1, dont la réaction est illustrée à la Figure 1, a été utilisée pour évaluer le métabolisme cellulaire (Berridge *et al.*, 1996).



**Figure 1 : Réaction de transformation mitochondriale du WST-1 en sel de formazan**

[Inspirée du guide d'utilisation du réactif (Roche, 2011)]

Un kit prêt à l'emploi a été acheté de la compagnie Roche (Laval, Québec, Canada), et a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, les cellules ont été ensemencées en triplicata dans des plaques de 96 puits, à raison de 5 000 cellules/puits pour les cellules F98 et U-87 MG, et de 6 667 cellules/puits pour les cellules U-118 MG et U-87 MG dans 200  $\mu$ L/puits de leur milieu de culture respectif. Un changement de milieu a été effectué 15 à 18h plus tard, soit après toute une nuit (O/N), de manière à amorcer le traitement de PPPS (0,1 et 0,4 mg/mL) ou de DMSO 0,16% une fois que les cellules avaient bien adhéré au fond des puits. Pour éviter l'accumulation trop importante de déchets métaboliques, les cellules traitées 72 et 96h ont bénéficié d'un changement de milieu après 48h de traitement. Après 48, 72 ou 96h d'exposition à la PPPS ou au DMSO, 20  $\mu$ L de réactif WST-1 était ajouté au milieu de culture de chaque puits. Les plaques ont été incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durant 3h avec le réactif. Après 30 secondes d'agitation, l'absorbance à 460 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre PowerWave 340 et du

logiciel KC Junior (BioTek Instruments, Winooski, VT, États-Unis). La longueur d'onde ( $\lambda$ ) de référence utilisée était de 700 nm. Chaque test a été fait à 3 reprises (n=3).

### **1.15 Évaluation de l'invasion 3D**

La formation de sphéroïdes a été réalisée tel que décrit antérieurement (Mehta *et al.*, 2012). Brièvement, des cellules F98 et U-87 MG (600 000 cellules/puits) ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits de type *ultra low attachment microplate* (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, États-Unis). Après 24 à 48h de croissance, des sphéroïdes ayant un diamètre de 100  $\mu$ m ont été sélectionnés à l'aide d'un oculaire quadrillé (Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Allemagne), puis prélevés avec une seringue Hamilton et implantés à 1 mm de profondeur dans une matrice de laminine, de collagène de type IV et de protéoglycans. Cette matrice avait été préalablement préparée sur glace avec 200  $\mu$ L de Matrigel™ (BD Biosciences *Matrigel Matrix Growth Factor Reduced*) et 300  $\mu$ L de milieu de culture complété, contenant les différents traitements (pour une concentration finale de 0,096% DMSO, et de 0,06, 0,12 et 0,24 mg/mL de PPPS). Le mélange avait également été incubé à 37°C durant 30 min pour permettre la solidification. Aussi, lors de l'implantation, un certain volume de milieu de culture prélevé dans la seringue en même temps que le sphéroïde a dû être injecté. Or, le volume injecté a été réduit au minimum (quelques  $\mu$ L), de manière à ne pas liquéfier la matrice et à ne pas diluer la solution de traitement. Suite à l'implantation, 200  $\mu$ L de milieu de culture complet contenant le traitement ont été délicatement déposés à la surface de la matrice. Une photo de chaque sphéroïde (dans son plus grand diamètre) a été prise à l'aide d'une caméra Infinity2 (Lumenera Corporation, Ottawa, Ontario, Canada) à toutes les 24h, pour une durée totale de 168h. Pour chaque condition, 3 sphéroïdes ont été implantés, et chaque expérience a été répétée 3 fois. La croissance et l'invasion 3D des sphéroïdes de F98 ont été comparées en normalisant l'aire maximale (en pixels) d'un sphéroïde au temps X en fonction de l'aire du même sphéroïde au temps 0, l'aire ayant été calculée avec le logiciel Adobe Photoshop. Étant donné le caractère plus invasif des sphéroïdes de cellules U-87 MG, l'aire n'a pas pu être calculée; la comparaison entre les traitements est donc de nature qualitative pour cette lignée cellulaire.

### ***1.16 Détection de l'apoptose et étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux***

La cytométrie en flux a été utilisée pour étudier la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et pour identifier les cellules hypodiploïdes (1n), reconnues dans la littérature pour correspondre aux cellules apoptotiques (Riccardi et Nicoletti, 2006). Pour réaliser cette expérience, nous avons sensiblement suivi les mêmes étapes que celles décrites antérieurement (Riccardi et Nicoletti, 2006; Sun et Liu, 2008; Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Les cellules ont tout d'abord étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 300 000 cellules/puits pour les F98 et les U-87 MG, et de 250 000 cellules/puits pour les U-118 MG. Après avoir laissé les cellules adhérer au fond du puits O/N, le milieu de culture a été changé pour du milieu contenant soit du DMSO 0,16% ou de la PPPS 0,1, 0,2 ou 0,4 mg/mL, pour un traitement de 24h. Le cisplatine étant reconnu pour induire l'apoptose (Kanzawa *et al.*, 2004), un contrôle positif a été obtenu avec un traitement de 24h avec du cisplatine (Sigma-Aldrich) 20 µg/mL (F98 et U-118 MG) et 50 µg/mL (U-87 MG). À la fin du traitement, le milieu de culture a été prélevé, et les cellules ont été rincées 2 fois avec 2 mL de PBS (lequel a été transféré dans le même tube que le milieu de culture). Les cellules ont ensuite été recueillies à la suite d'une incubation de 5 min avec un mélange de trypsine-EDTA à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après un double rinçage du puits avec une combinaison de Versene et de FBS 2%, le tube contenant le milieu de culture, les cellules et les solutions de rinçage ont été centrifugées durant 8 minutes à 295g. Le surnageant a été aspiré, et un nouveau rinçage avec du Versene-FBS 2% a été exécuté, suivi d'une deuxième centrifugation avec les mêmes paramètres. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 50 µL de Versene-FBS 2%. Après avoir été réchauffées 5 minutes dans un bain à 37°C, 450 µL de Versene contenant 0,05% de saponine ont été ajoutés. Le mélange a immédiatement été mis sur glace pendant 5 minutes, avant d'être centrifugé 5 minutes à 300g. Le surnageant a été partiellement aspiré, en ne laissant que 50 µL dans lesquelles le culot a été resuspendu. Finalement, 200 µL de Versene contenant 20 µL/mL de ribonucléase (RNase; Roche, Laval, Québec, Canada) et 10 µL/mL d'iodure de propidium (PI; Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) ont été ajoutés, puis incubés à température ambiante dans un environnement obscur durant 30 minutes. Les échantillons ont été analysés par un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, États-Unis) équipé d'un laser à l'argon de 15 mW, dont la longueur d'onde d'émission est de 488 nm. La

fluorescence émise par le PI a été décelée avec un filtre détectant les ondes de  $>650$  nm. La distribution de l'intensité de fluorescence, permettant d'identifier les cellules apoptotiques, a été analysée avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, États-Unis), alors que la répartition des cellules dans le cycle cellulaire a été calculée par le logiciel ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, États-Unis). Chaque expérience a été reproduite à 3 reprises.

### ***1.17 Extraction protéique***

Les 3 lignées cellulaires utilisées ont étéensemencées et traitées préalablement dans des pétris de 10 mm. Une fois le surnageant aspiré, et les cellules rincées 2 fois avec du PBS 1X, les cellules ont été lysées, sur glace et sous agitation, à l'aide d'une solution composée de tampon HEPES 500 mM (pH 7,4) 1% dodécylsulfate de sodium (SDS) et 1% Triton X-100, durant 5 à 10 minutes. Elles ont ensuite été recueillies au moyen d'un grattoir. Durant ce temps, le milieu de culture et les solutions de rinçage ont été centrifugés à 300g durant 10 minutes, puis le surnageant a été jeté, et le culot a été lysé dans les mêmes conditions que les cellules. Après avoir combiné le lysat du culot et des cellules correspondantes, le matériel cellulaire a été soniqué sur glace à intensité modérée, l'équivalent de 10 fois 1 seconde. Les lysats ont ensuite été mélangés délicatement en pipetant 6 fois, puis ils ont été centrifugés à 14 000 RPM durant 15 minutes à 4°C. Les protéines ont été dosées par spectrométrie à l'aide d'un kit à base d'acide bicinchonique (*BCA Protein Assay Reagent*, Thermo Scientific, Rockford, IL, États-Unis). Les extraits protéiques ont été aliquotés puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### ***1.18 Détection de l'apoptose et de l'autophagie par immunobuvardage de type western***

50 µg de protéines totales ont été diluées dans un tampon Tris (*Tris buffered saline Tween*, TBST) pour un volume total de 50 µL, et ont été chauffées à 95°C durant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5%-10%. L'électrophorèse a été effectuée à 110 V durant les 30 premières minutes, puis à 120 V. La migration a été suivie avec un marqueur de poids moléculaire (de marque *PageRuler*).

Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45  $\mu\text{m}$  à 4°C O/N à 10V, puis à 60V durant les 30 dernières minutes, dans du tampon de transfert à base de glycine, de Tris, de SDS et de méthanol. L'efficacité du transfert a été vérifiée en colorant le gel avec du bleu de Coomassie, et la membrane avec du rouge de Ponceau. Après rinçage, les membranes ont été coupées en fonction des poids indiqués par le marqueur de poids moléculaire. Elles ont ensuite été bloquées 1h à température ambiante, avec soit du TBS 10% lait, 0,05% Tween-20, soit du TBS 5% lait, 0,1% Tween-20, tout dépendant de l'anticorps primaire à utiliser pour chaque section de la membrane. Le Tableau 2 ci-dessous résume les conditions qui ont été utilisées pour chaque anticorps.

**Tableau 2 : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type western**

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Hôte</b>	<b>Dilution</b>	<b>Solution de dilution</b>	<b>Provenance</b>
Anti-LC3	lapin	1:1000	TBS 10% lait, 0,05% Tween-20	Sigma L8918
Anti-p62	souris	1:5000	TBS 10% lait, 0,05% Tween-20	BD 610832
Anti-caspase-3 clivée (Aps175)	lapin	1:1000	TBS 5% lait, 0,1% Tween-20	Cell Signaling 9661
Anti-actine	lapin	1:1000	Selon l'anticorps dont le chargement est à contrôler (voir ci-haut)	Santa Cruz Biotechnology, H-196:sc-7210
<b>Anticorps secondaires</b>	<b>Dilution</b>		<b>Solution de dilution</b>	<b>Provenance</b>
Anti-lapin couplé à l'HRP*	1:2500		Selon l'anticorps primaire	GE Healthcare NA934VS
Anti-souris couplé à l'HRP*	1:2500		TBS 10% lait, 0,05% Tween-20	Cell Signaling 7076

\* HRP : peroxydase de raifort

Les anticorps primaires ont par la suite été incubés 4 °C O/N sous agitation constante. Le lendemain, les membranes ont été lavées à 6 reprises avec leur tampon de blocage respectif (voir ci-haut). Les anticorps secondaires ont ensuite été incubés 1h à la température de la pièce. Après 6 autres lavages avec la solution de blocage appropriée, les membranes ont été exposées au substrat de la peroxydase de raifort (HRP) (*ECL Advance Western Blotting Detection Kit*, GE Healthcare) selon les recommandations du fabricant. Le marquage a

finaleme nt été révé lé sur des films à autoradiographie Hyperfilm<sup>®</sup> ECL (Amersham, GE Healthcare).

### ***1.19 Analyse statistique***

Tous les tests statistiques des expérimentations *in vitro* ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Le seuil de significativité statistique a été établi à 0,05. L'analyse des tests de métabolisme cellulaire (WST-1), de la population hypodiploïde et de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire a été faite par analyse de la variance (ANOVA), suivie d'une comparaison post-test à l'aide du test de Dunnett. L'analyse de l'aire des sphéroïdes a été faite à partir de l'ANOVA.

## **Volet *in vivo***

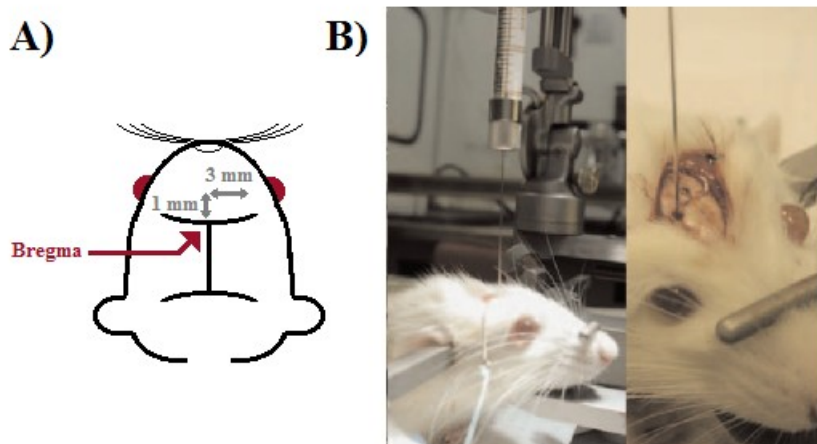
### ***1.20 Modèle murin Fischer-F98***

Le modèle de rats Fischer-F98, bien caractérisé dans notre laboratoire, a été employé pour l'évaluation des effets *in vivo* de la PPPS (Mathieu *et al.*, 2007). 24 rats mâles (sains) ont été achetés de Charles River (Sherbrooke, Québec, Canada), et ont été distribués de façon aléatoire en 3 groupes (8 rats/groupe) : un groupe contrôle, gavé avec de l'eau, et 2 groupes traités avec respectivement 61,71 et 123,43 mg/kg de PPPS. Le poids des rats variait entre 210 et 230 g au jour #0, c'est-à-dire la journée de l'implantation. Un suivi clinique des rats et la mesure de leur poids ont été effectués au moins une fois par jour, tout au long de l'étude. À partir du 10<sup>e</sup> jour post-implantation (jour #10), les rats ont été gavés quotidiennement avec de l'eau ou avec de la PPPS, et ce, jusqu'au jour de l'euthanasie. De manière à réduire le plus possible les biais au sein de l'étude, les 3 groupes ont été comblés et traités en parallèle. Le protocole de l'étude *in vivo* (# 262-10) a été approuvé par le Comité d'éthique de l'expérimentation animale de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke en février 2011.



### 1.21 Technique d'implantation

Le protocole d'implantation a été appliqué conformément à la technique optimale présentée dans l'article de Mathieu *et al.* en 2007. Brièvement, une anesthésie générale avec une combinaison de kétamine (87 mg/kg) et de xylazine (13 mg/kg) intramusculaire a été utilisée. Après fixation de la tête du rat au cadre stéréotaxique (World Precision Instruments, Sarasota, FL, États-Unis), une incision cutanée permettait l'identification de *bregma* comme point de référence (voir Figure 2A). À l'aide d'une aiguille 16G, un trou de trépan était créé en frontal droit, 1 mm antérieurement et 3 mm latéralement à *bregma*. 5  $\mu$ L de milieu de culture contenant 10 000 cellules F98 étaient par la suite injectés à 6 mm de profondeur (dans le putamen), à un débit constant de 1  $\mu$ L/min. Le trou de trépan était par la suite refermé avec de la cire à os, et l'incision cutanée suturée avec du fil résorbable de type Dexon 3-0.



**Figure 2 : Coordonnées et technique d'implantation**

A) Représentation visuelle des coordonnées d'implantation par rapport au point *bregma*  
 B) Technique d'implantation à l'aide du cadre stéréotaxique (tirée de Mathieu *et al.*, 2007)

### 1.22 Gavage

Tel que mentionné précédemment, les rats des 3 groupes ont été gavés une fois par jour, à partir du jour #10 et jusqu'à la fin de l'étude. Les 2 concentrations de PPPS, soit 61,71 et 123,43 mg/kg, ont été choisies en fonction des informations de la compagnie

AppleBoost™. En effet, ces concentrations correspondraient respectivement à l'ingestion de 3 et 6 pommes/jour pour un humain de 70 kg. Les préparations de PPPS et l'eau ont été administrées à raison de 10 mL/kg (Brown *et al.*, 2000). Étant donné la faible solubilité de la PPPS dans l'eau, chaque solution de PPPS n'a été préparée que quelques minutes avant le gavage. En outre, l'apport nutritif quotidien des animaux était comblé par un accès illimité à de l'eau et à la nourriture habituelle destinée aux rats.

### ***1.23 Suivi de la progression tumorale par IRM et analyse radiologique***

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été employée pour suivre la progression du volume des tumeurs, de manière à comparer la cinétique de croissance des tumeurs entre les groupes. Trois des 8 rats de chaque groupe ont été sélectionnés au hasard pour subir un IRM de contrôle aux jours #10 et #20. Ce nombre limité de rats s'explique par le fait qu'il n'était pas possible de procéder à l'IRM sur tous les rats pour des questions de budget, et qu'il a été démontré dans le passé par notre laboratoire que 3 rats par groupe était un nombre suffisamment sensible pour observer des différences significatives (Blanchette *et al.*, 2009). Cette procédure a été réalisée sous anesthésie générale à l'isoflurane (pour l'induction et le maintien). La veine caudale a été préalablement canulée, pour permettre l'injection de l'agent de contraste au moment voulu. Un scanner IRM de 7 teslas (Varian Inc. Palo Alto, CA, États-Unis) avec un entrefer de 210 mm et une bobine de 63 mm a été utilisé. Les images ont été acquises tel que décrit précédemment (Blanchette *et al.*, 2009). Brièvement, pour chaque rat, 10 tranches de 1,5 mm ont été acquises, de manière à couvrir l'encéphale en entier (du bulbe olfactif au lobe occipital). Un champ de 4 x 4 cm<sup>2</sup>, une matrice de 128 x 128, un temps de répétition de 100 ms, un temps d'écho de 2,5 ms, et 4 moyennes complétaient les paramètres d'acquisition. Un balayage en pondération T1 était tout d'abord réalisé avec une approche multi-angulaire (avec des angles de bascule de 10°, 20°, 25, 35° et 50°) Puis, une acquisition dynamique a été effectuée en scannant la série de 10 tranches à toutes les 51 s, pour un total de 50 séries. 3 minutes après le début de la série dynamique, un bolus de 500 µL (0,143 M) d'un agent de contraste T1, soit le gadopentétate de diméglumine (Magnevist®; Bayer HealthCare, Montréal, Québec, Canada), ont été injectés sur 60 secondes via la canule caudale. L'analyse des images obtenues (5 min après

l'injection du contraste) a été réalisée avec le logiciel MATLAB (MathWorks, 2007) et avec un script de segmentation fait sur mesure par la Plateforme d'analyse et de visualisation d'images du Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. Le volume tumoral a donc été calculé en pondérant la région rehaussée par le contraste et en attribuant une pondération maximale au centre nécrotique, dont l'absence de vascularisation limite le rehaussement. La croissance tumorale a été calculée en faisant le ratio des volumes des jours #20 et #10. La valeur statistique a été évaluée par un test de Kruskal-Wallis.

#### ***1.24 Technique et critères d'euthanasie***

Lors du suivi quotidien des animaux, les signes d'hypertension intracrânienne (comme la léthargie et la cachexie) de même que les signes neurologiques focalisateurs (comme une hémiparésie ou l'ataxie) ont été spécifiquement recherchés. Les points limites de l'étude étaient l'asthénie, la léthargie profonde, les difficultés respiratoires ou la présence de signes focalisateurs. Dès qu'au moins un des points limites était atteint, l'animal était anesthésié par inhalation d'isoflurane, puis euthanasié par perfusion intracardiaque (dans le ventricule gauche) d'une solution de formaline 10% (Fisher Scientific) et par exsanguination en sectionnant l'oreillette droite. La survie de chaque animal a été notée pour des fins de comparaison entre les groupes.

#### ***1.25 Prélèvement, conservation et préparation des spécimens cérébraux***

Immédiatement après l'euthanasie, le cerveau des rats a été prélevé pour des études histologiques et immunohistochimiques. Une pince chirurgicale de type *hémostat* a été utilisée pour morceler la boîte crânienne avec précaution, de manière à ne pas léser le cerveau. Après dissection des méninges et des nerfs crâniens, le cerveau a été prélevé, puis conservé quelques mois dans la solution de formaline 10% à la température de la pièce. À l'aide d'un *Brain Matrix* (World Precision Instruments, Sarasota, FL, États-Unis) et d'une lame de rasoir, chaque cerveau a été coupé dans le plan coronal de manière à obtenir les 3 sections, tel que décrit dans une étude faite antérieurement dans notre laboratoire (Blanchette *et al.*, 2012). Chaque section a ensuite été placée dans une cassette d'histologie,

puis envoyée à la Plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke pour y être circulée, déshydratée et paraffinée. La section contenant le site d'implantation des cellules cancéreuses, donc le plus grand diamètre tumoral d'après nos estimés, a été coupée en de fines tranches de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au moyen d'un microtome Leica RM2125 RTS gracieusement prêté par le laboratoire du Dr Guillaume Sébire. Une fois déposées sur des lames, les coupes ont été séchées à l'air libre durant toute une nuit.

### ***1.26 Évaluation de la taille des tumeurs par coloration H&E***

Pour chaque cerveau, une tranche représentant le plus grand diamètre tumoral a été réservée pour une coloration H&E. Brièvement, les lames ont été déparaffinées puis réhydratées en les immergeant successivement 1 minute dans chacune des solutions suivantes : du xylène (à 3 reprises), de l'éthanol 100% puis 70% puis 50%, et finalement dans l'eau courante. Les lames ont ensuite été colorées en les immergeant 2 minutes dans l'hématoxyline. Elles ont par la suite été rincées successivement 1 minute dans de l'eau courante, avant d'être plongées 5 fois dans l'alcool acide (12 gouttes de HCl 20% dans un bain) puis lavées durant 2-3 minutes sous l'eau courante et plongées à 7 reprises dans une solution de carbonate de lithium. Après 5 minutes de lavage à l'eau courante, 1 plongeon dans l'éthanol 50% et un autre plongeon dans l'éthanol 70%, la contre-coloration a été réalisée avec de l'éosine Y par une immersion de 30 secondes. Les lames ont finalement été déshydratées en les plongeant successivement 2 fois dans l'éthanol 50% puis 70% puis 100 en finissant dans le toluène. Les lames ont ensuite été séchées à l'air libre O/N avant d'être montées avec des lamelles. Elles ont par la suite été numérisées à l'aide d'un scanner Nikon Scan 4.0, puis analysées avec le logiciel Image-Pro Plus, fait par MediaCybernetics (Silver Springs, MD, États-Unis). L'analyse a été basée sur la distinction, par le logiciel, des deux principales couleurs présentes sur la coupe, soit le violet et le magenta, ce qui a permis le calcul automatique de la proportion de pixels violets par rapport aux pixels magenta afin de générer une surface.

### 1.27 Études immunohistochimiques

Pour chaque cerveau, des coupes provenant toujours de la même section ont été préparées tel qu'indiqué ci-haut, et les études immunohistochimiques ont été réalisées tel que décrit précédemment (Babeu *et al.*, 2009). Tout d'abord, les lames ont été chauffées à 60°C durant 15 min de manière à déparaffiner et à hydrater les coupes. Elles ont ensuite été immergées successivement deux fois durant 5 minutes dans le xylène, deux fois 2 minutes dans l'éthanol 100%, deux fois 1 minute dans l'éthanol 95%, 1 minute dans l'éthanol 80%, 1 minute dans l'éthanol 70% et 1 minute dans l'eau du robinet. Elles ont ensuite été submergées dans une solution de 10 mM d'acide citrique 5 mM à pH 6,0 (Fisher Scientific), laquelle a été chauffée à intensité maximale dans un micro-ondes jusqu'à 6 minutes d'ébullition. Puis, la solution d'acide citrique a été laissée 10 minutes à la température de la pièce pour lui permettre de refroidir, avant de rincer les lames sous l'eau courant durant 10 minutes. Après 2 lavages de 5 minutes dans un tampon phosphate salin (PBS) 1X, la région contenant la coupe a été circonscrite sur chaque lame au moyen d'un crayon hydrophobe PAP Pen (Vector Laboratories, CA, États-Unis). Les antigènes ont été bloqués durant 40 minutes à température ambiante et dans un environnement humidifié avec une solution de blocage (Beckman Coulter Canada, Mississauga, Ontario, Canada). Les anticorps primaires contre la caspase-3 clivée (Cell Signaling #9661, Beverly, MA, États-Unis; 1:50) et contre le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA; Santa-Cruz Biotechnology #FL-261, Santa Cruz, CA, États-Unis; 1:750) ont été dilués dans une solution de PBS 1X, d'albumine sérique bovine (BSA) 10% et de Triton X-100 10% (solution communément appelée PBT) et ont été ajoutés directement à la solution blocage. Les lames ont ainsi été incubées O/N à 4°C. Après 2 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Dako) a été ajouté et incubé 1h45 à la température de la pièce. Après l'ajout du 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Dako), une contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline de Gill (PolyScientific) et de l'eau ammoniacale. Une série de lavages durant 2 minutes chacun, avec (dans l'ordre) de l'eau, de l'éthanol 70% puis 95%, 100% 100% et du xylène (1 min) a complété le processus. Les lames ont finalement été montées avec du Cytoseal 60 (Fisher Scientific). Un contrôle négatif a également été préparé en parallèle pour chaque spécimen, en omettant l'ajout de l'anticorps primaire. Les tissus ont été observés à l'aide d'un microscope Olympus FSX100. Pour chaque lame,

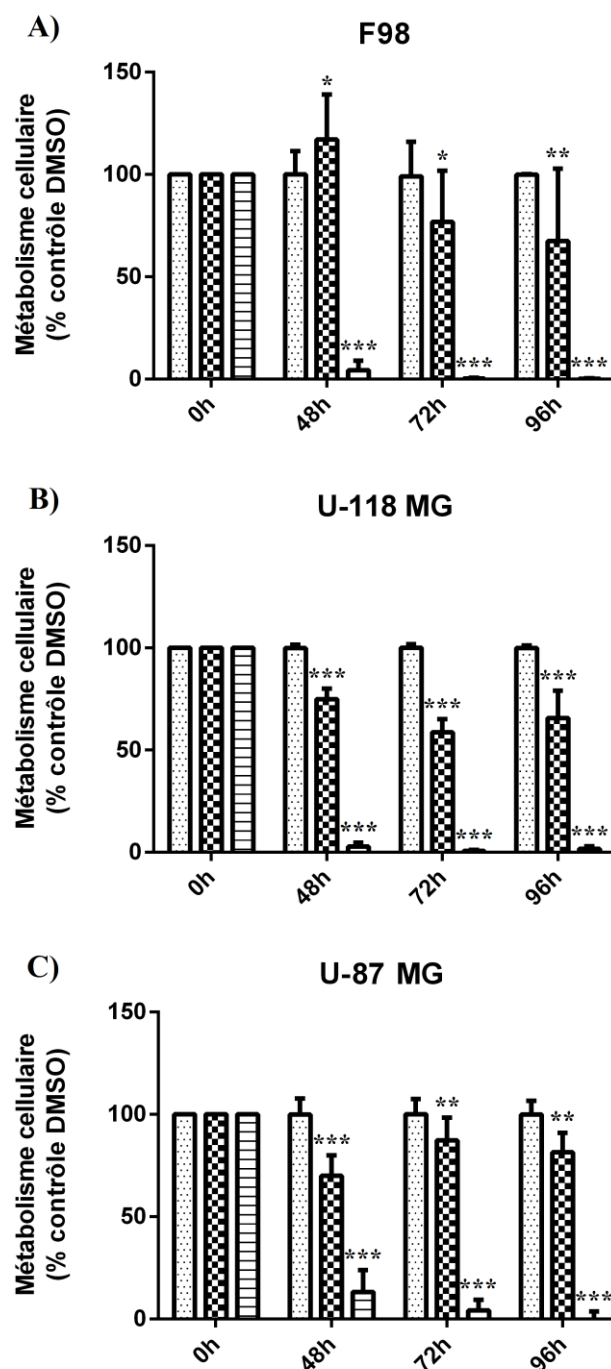
5 images correspondant à des régions représentatives de tumeur active (centre nécrotique exclu) ont été analysées avec le logiciel Image-Pro Plus, de MediaCybernetics (Silver Springs, MD, États-Unis), par un décompte informatisé du nombre de cellules marquées.

## RÉSULTATS

### **Effets anticancéreux *in vitro* impliquant plusieurs phénomènes cellulaires**

#### ***1.28 Inhibition du métabolisme des lignées F98, U-118 MG et U-87 MG***

La transformation mitochondriale du WST-1 a été utilisée afin d'évaluer le métabolisme cellulaire des cellules. Dans la littérature, ce type d'expérimentation est souvent employé dans les études de prolifération cellulaire et de cytotoxicité (Roche, 2011). Les trois lignées cellulaires à l'étude ont été initialement exposées durant 48, 72 ou 96h à la PPPS 0,1 et 0,4 mg/mL, avant que le réactif WST-1 soit ajouté au milieu de culture. L'absorbance mesurée à 460 nm corrèle avec la concentration sel de formazan formé lors de la transformation cellulaire du WST-1. Cette mesure a permis l'évaluation du métabolisme relatif selon le traitement cellulaire. Les résultats, présentés à la Figure 3, démontrent une différence significative dans le métabolisme cellulaire (calculée par ANOVA, avec une comparaison post-test de Dunnett) dans les trois lignées cellulaires, aux trois temps de traitement avec la PPPS 0,1 et 0,4 mg/mL. L'exposition à la PPPS 0,1 mg/mL durant 72 et 96h diminue d'environ 35% le métabolisme des cellules F98 et U-118 MG, et de 15% celui des cellules U-87 MG. Il faut dire aussi que l'exposition à la PPPS 0,4 mg/mL rend la transformation du WST-1 pratiquement nulle. En général, l'effet de la PPPS est comparable sur les 3 lignées à l'étude. Dans presque tous les cas, un traitement d'au moins 48h à la PPPS diminue le métabolisme. La seule exception touche les cellules F98 traitées 48h à la PPPS 0,1 mg/mL. En effet, dans ces conditions, le métabolisme cellulaire semble significativement augmenté par rapport au contrôle DMSO, bien qu'ayant un large écart-type.



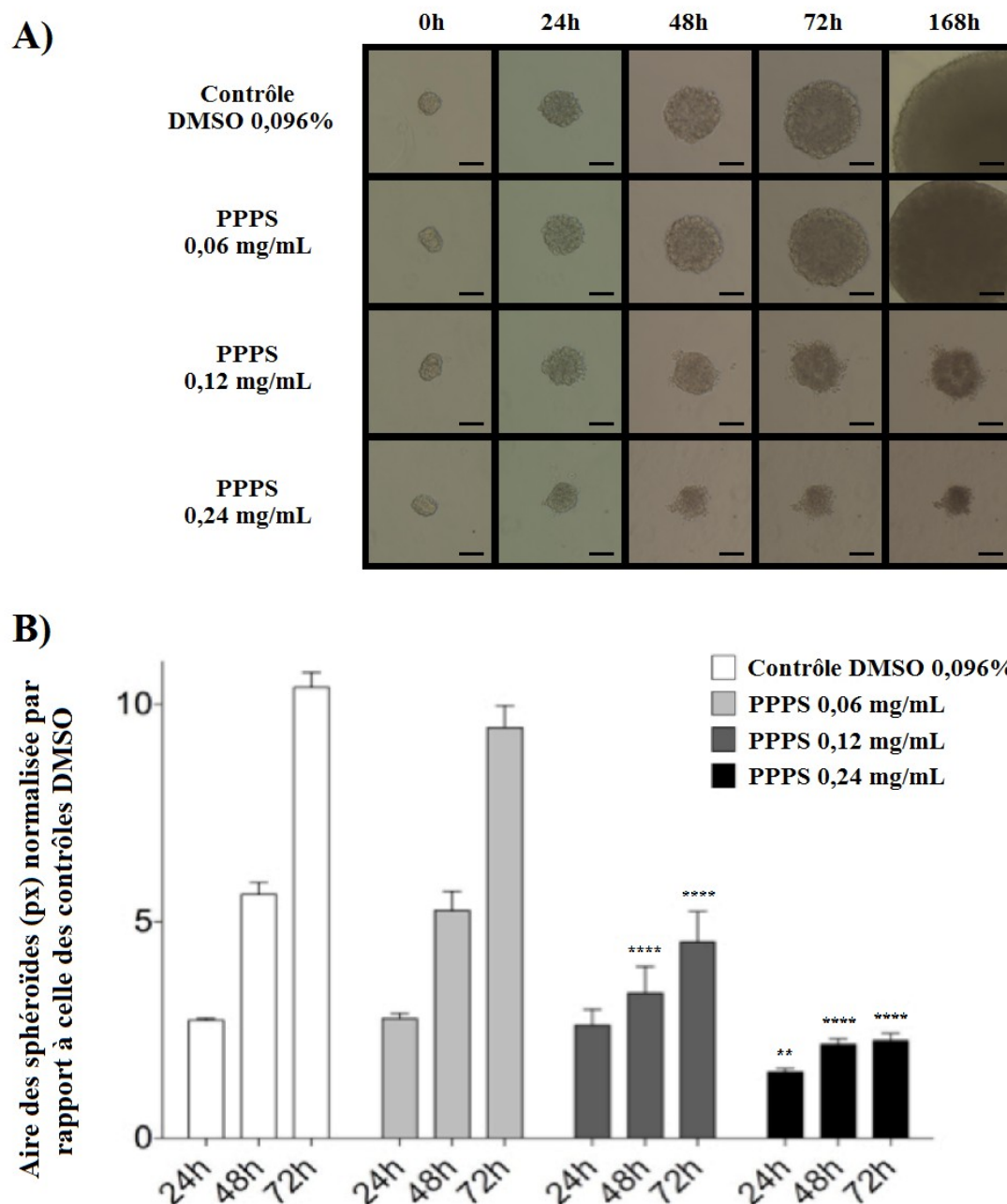
**Figure 3 : Inhibition du métabolisme cellulaire par la PPPS dans les 3 lignées**

Les cellules **A)** F98, **B)** U-118 MG et **C)** U-87 MG ont été exposées au DMSO 0,16% (□), à la PPPS 0,1 mg/mL (▤) ou 0,4 mg/mL (▨) durant 48, 72 ou 96h. Les valeurs d'absorbances corrigées ( $\lambda_{460}$  nm -  $\lambda_{700}$  nm) ont été normalisées par rapport à celles des contrôles DMSO 0,16% et sont exprimées en %. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. (significativité par rapport au contrôle DMSO; \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ )



### ***1.29 Inhibition de la croissance 3D des sphéroïdes de F98 et de U-87 MG***

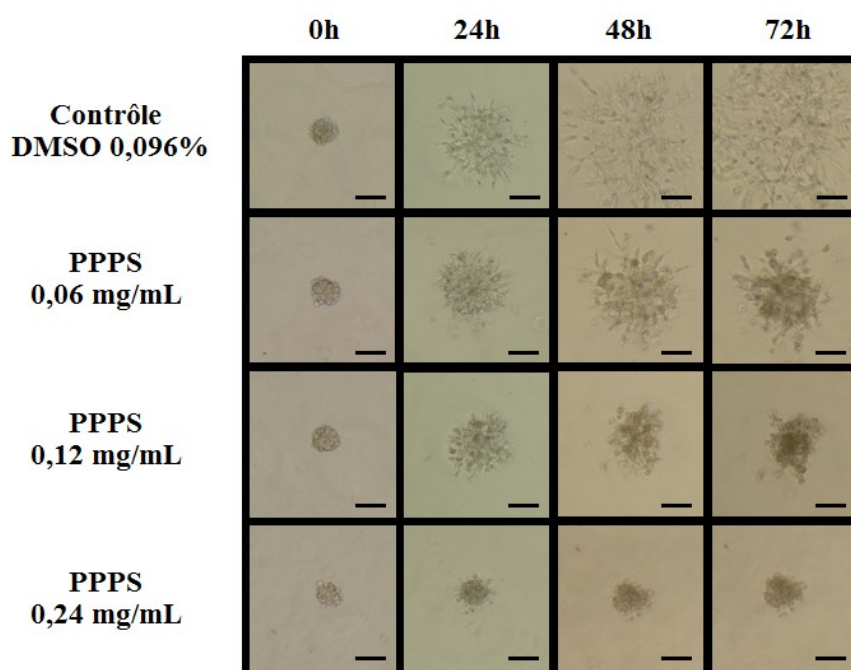
Des sphéroïdes, formés par l'ensemencement de cellules F98 et U-87 MG dans des plaques ne favorisant pas l'adhésion aux parois, ont été sélectionnés en fonction du diamètre optimal établi par des expériences antérieures dans notre laboratoire (résultats non publiés), soit 100  $\mu\text{m}$ . Les cellules U-118 MG ne formant pas de sphéroïdes dans notre laboratoire (résultats non publiés), cette lignée cellulaire n'a pas pu être employée pour cette expérimentation. Les sphéroïdes de taille souhaitée ont été implantés dans une matrice de collagène représentant du milieu extracellulaire. Le fait que la solution de traitement soit mélangée avec le milieu de culture et avec le Matrigel<sup>TM</sup> assurait une exposition maximale des sphéroïdes au traitement. Aussi, le fait d'implanter les sphéroïdes à 1 mm de la surface permettait d'éviter qu'ils n'atteignent le fond du puits. Pour chaque condition de traitement, 3 sphéroïdes ont été implantés à distance l'un de l'autre, et l'expérience a été réalisée 3 fois. Tel que le démontre la Figure 4, les sphéroïdes avaient tous sensiblement la même taille lors de l'implantation, ce qui suggère que le processus d'implantation n'altérerait pas les sphéroïdes. Le traitement à la PPPS 0,06 mg/mL n'a eu aucun effet significatif sur la croissance et sur l'invasion des sphéroïdes de F98. Par contre, dès la 48<sup>e</sup> heure de traitement, une différence significative a été observée dans les puits contenant 0,12 et 0,24 mg/mL de PPPS. L'inhibition de la croissance et de l'invasion sur les sphéroïdes de F98 était plus marquée avec la plus haute concentration de PPPS. En effet, l'aire moyenne des sphéroïdes était réduite de moitié après une exposition de 48h à la PPPS 0,4 mg/mL, et représentait le quart de l'aire moyenne des sphéroïdes contrôles après de 72h de PPPS haute concentration. Les photos des sphéroïdes après 168h (7 jours) exposées à la Figure 4A sont à titre indicatif seulement, l'analyse des images au-delà de 72h étant impossible à cause du diamètre qui excédait le cadre de la caméra.



**Figure 4 : Inhibition de la croissance et de l'invasion 3D des sphéroïdes F98**

Ils ont été exposés 24, 48, 72 et 168h au DMSO 0,096% ou à la PPPS 0,06, 0,12 ou 0,24 mg/mL. **A)** Photos représentatives (100X) des sphéroïdes de F98. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu$ m. **B)** Analyse graphique de la croissance des sphéroïdes selon la concentration de PPPS dans le Matrigel<sup>TM</sup>. 3 sphéroïdes ont été implantés dans chaque puits, et l'expérience a été faite à 3 reprises. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. (significativité par rapport au contrôle DMSO correspondant; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ )

Le même type d'expérience a été réalisé avec des sphéroïdes de cellules U-87 MG. La seule modification apportée au protocole a été d'utiliser de l'EMEM complété plutôt que du DMEM, de manière à optimiser les conditions de culture des sphéroïdes. Aussi, l'analyse quantitative n'a pu être effectuée, étant donné que les cellules U-87 MG perdaient leur forme de sphéroïde pour infiltrer la matrice. La mesure du plus grand diamètre ou de la distance parcourue par les cellules se serait avérée inadéquate, puisque les photos ne peuvent être prises que dans un plan 2D. À la Figure 5, on peut voir que les sphéroïdes de U-87 MG étaient aussi de taille semblable au début de l'expérience. La prolifération et l'invasion des cellules dans le DMSO étaient évidentes. Les sphéroïdes exposés à la PPPS 0,06 mg/mL semblaient aussi proliférer et envahir la matrice durant les 48 premières heures. À 72h par contre, plusieurs cellules apparaissaient plus sphériques, comme quand elles s'engagent en apoptose. Le diamètre des sphéroïdes était moindre à 72h comparé à 48h de traitement. Le même phénomène est survenu avec les sphéroïdes exposés à la PPPS 0,12 mg/mL, mais plus précocement, c'est-à-dire après 24h. Les sphéroïdes baignant dans la PPPS 0,24 mg/mL semblaient avoir une croissance et une invasion 3D minimales.

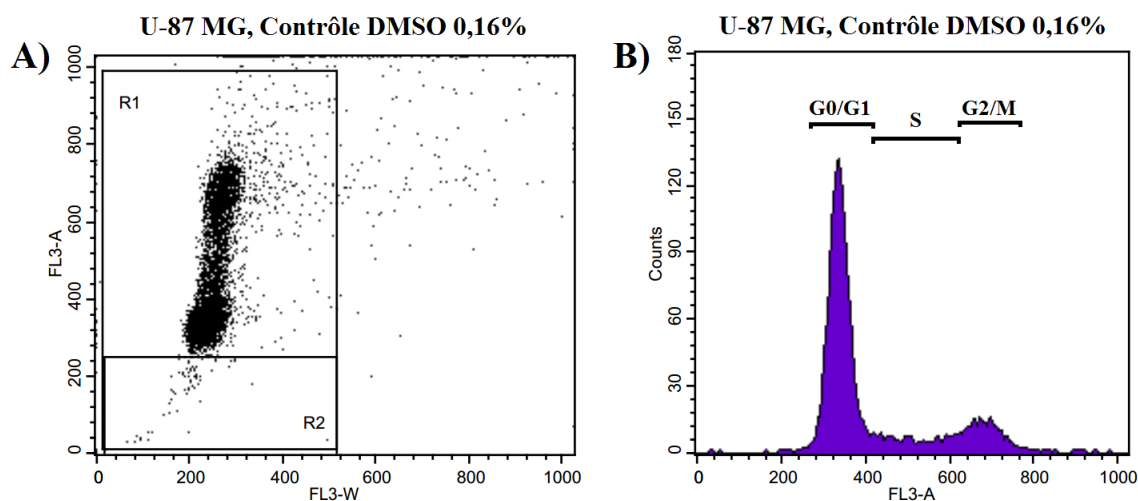


**Figure 5 : Inhibition de la croissance et de l'invasion 3D des sphéroïdes U-87 MG**

Photos représentatives (100X) des sphéroïdes de U-87 MG après une exposition de 24, 48 et 72h au DMSO 0,096% ou à la PPPS 0,06, 0,12 ou 0,24 mg/mL. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu$ m.

### 1.30 Inhibition de la prolifération cellulaire dans les F98

Comme indiqué précédemment, le cycle cellulaire est souvent étudié par cytométrie en flux grâce à l'incorporation d'un fluorophore. Le PI se liant aux acides nucléiques de façon stœchiométrique, l'utilisation combinée du PI et d'une RNase est une bonne façon d'évaluer le contenu en ADN d'une cellule. Or, puisque celui-ci varie au cours tout au long du cycle cellulaire, l'étude du contenu en ADN par cytométrie en flux produit un graphique caractéristique, à partir duquel les différentes phases du cycle ainsi que la proportion relative des cellules dans chaque phase peuvent être déduites. Un graphique typique est montré à la Figure 6 ci-dessous. Tel qu'expliqué lors de la section *Matériel et Méthodes*, le pic de cellules en G2/M (tétraploïdes) est identifiable par son contenu deux fois plus fluorescent que celui des cellules en G0/G1 (diploïdes).



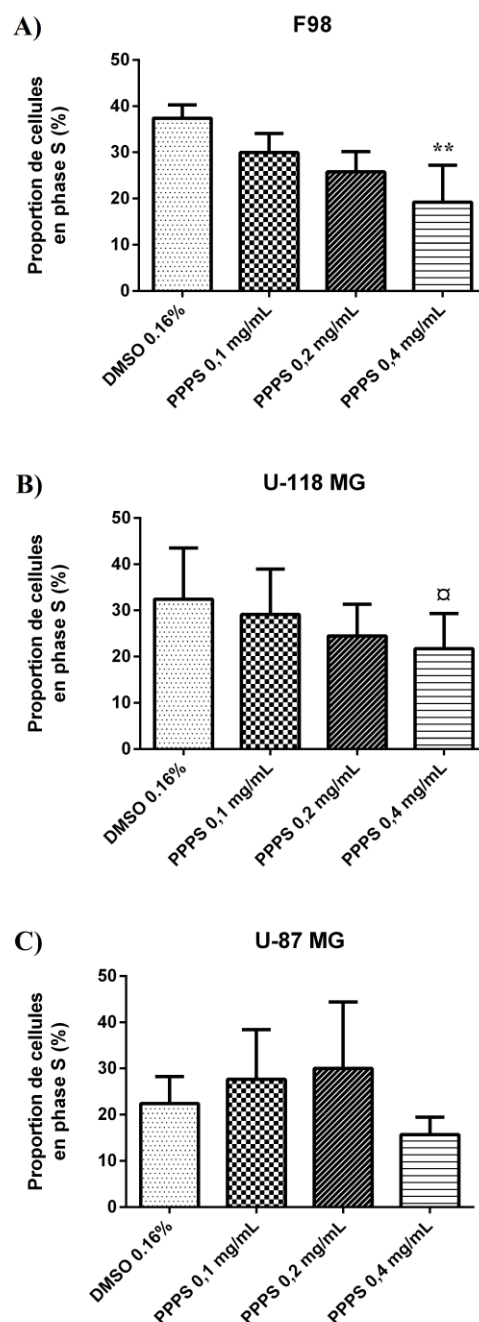
**Figure 6 : Graphiques typiques obtenus par le logiciel CellQuest lors de l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux**

**A)** Nuage de points représentant les cellules marquées selon leur taille (FL3-W) et selon l'intensité de leur fluorescence (FL3-A) détecté avec le filtre de  $>650$  nm (FL3).  
**B)** Transposition des éléments de FL3-A sur l'axe des abscisses, avec en ordonnées le décompte des cellules détectées pour chaque intensité de fluorescence.

C'est ainsi que les résultats de la Figure 7 ont été obtenus. Après une exposition de 24h au DMSO 0,16% ou à la PPPS 0,1, 0,2 et 0,4 mg/mL, les cellules F98, U-118 MG et U-87 MG ont été préparées pour l'analyse par cytométrie en flux. Les cellules adhérentes au fond des

puits et flottantes dans le milieu ont tout d'abord été prélevés, rincés puis resuspendus dans un petit volume de Versene. Une perméabilisation partielle de la membrane avec de la saponine a permis l'entrée du PI et de la RNase dans les cellules. Les échantillons ont été incubés 30 minutes dans le noir à la température ambiante, afin de laisser le PI s'incorporer complètement dans l'ADN. L'analyse logicielle des graphiques obtenus a permis d'établir le pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle.

Le graphique A de la Figure 7 démontre une diminution significative de la proportion de cellules F98 en phase S après un traitement de 24h à la PPPS 0,4 mg/mL ( $19,22 \pm 8,01\%$ ) comparativement au contrôle DMSO ( $37,39 \pm 2,87\%$ ). Une tendance dans le même sens a été observée avec les cellules U-118 MG exposées au même traitement, sans être toutefois statistiquement significative ( $21,74 \pm 7.56\%$  versus  $32,43 \pm 11,07\%$ ). La répartition des cellules U-87 MG, quant à elle, ne semble pas avoir été influencée par les traitements.



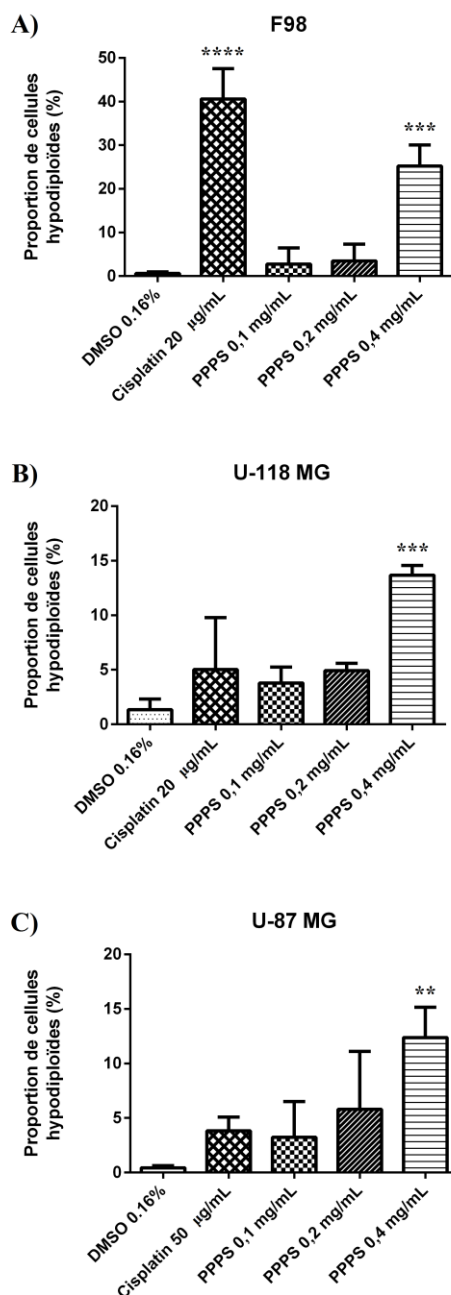
**Figure 7 : Diminution de la proportion des cellules en phase S chez les cellules F98**

Les lignées **A)** F98, **B)** U-118 MG et **C)** U-87 MG ont été exposées 24h au DMSO 0,16% et à la PPPS 0,1, 0,2 et 0,4 mg/mL, avant d'être analysées par cytométrie en flux. Chaque expérience a été faite à trois reprises (n=3). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. (significativité par rapport au contrôle DMSO; \*\* :  $p < 0,01$ ; □ : tendance, c'est-à-dire  $0,05 < p < 0,1$ )

### ***1.31 Augmentation de la population hypodiploïde dans les 3 lignées***

Le protocole d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux décrit ci-haut permettait également la détection de cellules hypodiploïdes, communément associées au phénomène apoptotique dans la littérature scientifique (Riccardi et Nicoletti, 2006). Les cellules hypodiploïdes apparaissent dans le rectangle identifié R2 de la Figure 6A, ou à gauche du pic de G0/G1 de la Figure 6B. Elles sont peu présentes dans l'exemple de la Figure 6, puisqu'il s'agissait d'un échantillon de contrôle (DMSO 0,16%). Pour cette expérimentation, un contrôle positif d'apoptose a été réalisé en exposant durant 18h les cellules F98 et U-118 MG au cisplatine 20 µg/mL et les cellules U-87 MG au cisplatine 50 µg/mL.

Les résultats sont présentés à la Figure 8. Un traitement de 24h à la PPPS 0,4 mg/mL engendre une augmentation significative de cellules hypodiploïdes dans les lignées F98 ( $25,24 \pm 4,81\%$  versus  $0,65 \pm 0,33\%$ ), U-118 MG ( $13,67 \pm 0,89\%$  versus  $1,33 \pm 1,00\%$ ) et U-87 MG ( $12,38 \pm 2,77\%$  versus  $0,44 \pm 0,21\%$ ). Cependant, l'exposition à la PPPS 0,1 ou 0,2 mg/mL ne semble pas avoir d'effet significatif par rapport au contrôle DMSO 0,16%.



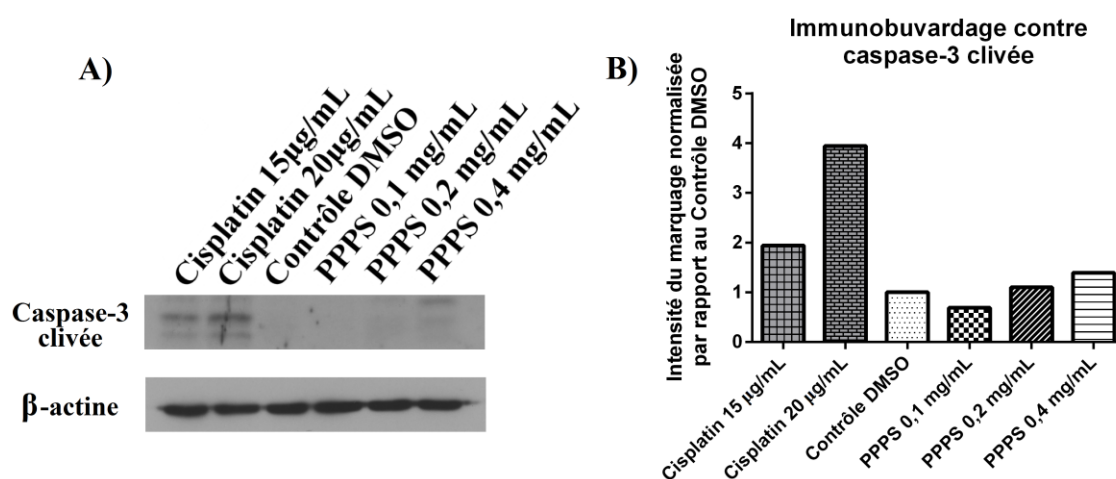
**Figure 8 : Augmentation de la proportion des cellules hypodiploïdes dans les 3 lignées**

Les lignées **A) F98**, **B) U-118 MG** et **C) U-87 MG** ont été exposées 24h au DMSO 0,16% ou à la PPPS 0,1, 0,2 et 0,4 mg/mL, et durant 18h au cisplatine 20 et 50  $\mu$ g/mL. Elles ont ensuite été analysées par cytométrie en flux. Chaque expérience a été faite à trois reprises (n=3). (significativité par rapport au contrôle DMSO; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ )



### 1.32 Augmentation de la caspase-3 clivée dans la lignée U-87 MG

Afin de vérifier l'hypothèse que la PPPS peut induire l'apoptose dans les cellules U-87 MG, la caspase-3 clivée a été quantifiée par immunobuvardage de type *western*. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 9. L'immunobuvardage, qui n'a été réalisé qu'une fois, est illustré en A. L'analyse des bandes, présentée en B, correspond au ratio de l'intensité du marquage du traitement sur celle du marquage du contrôle. Tout comme pour la détection de l'hypodiploïdie par cytométrie en flux, un contrôle positif au cisplatine 15 et 20  $\mu\text{g/mL}$  (traitement de 18h) a été utilisé.



**Figure 9 : Effet d'un traitement de 24h à la PPPS sur le clivage de la caspase-3 dans les cellules U-87 MG**

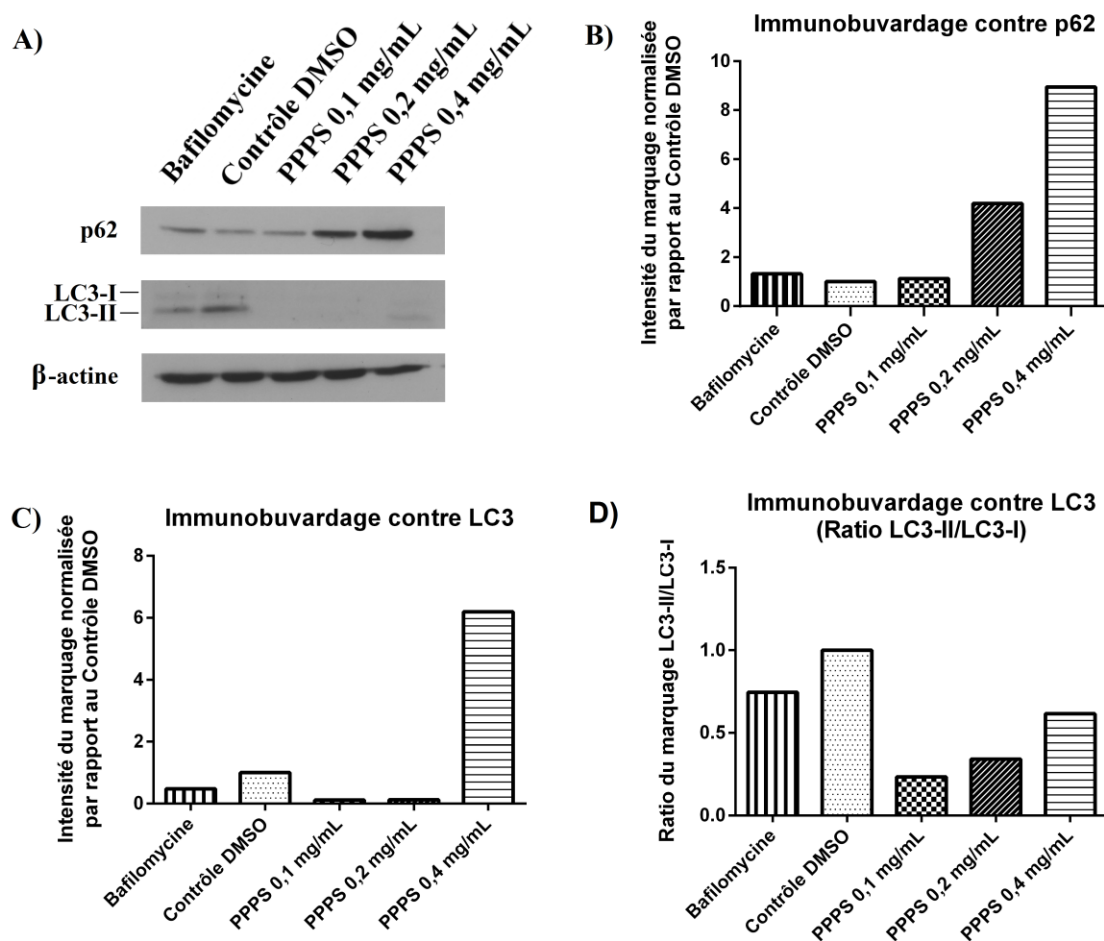
Une exposition de 18h au cisplatine 15 et 20  $\mu\text{g/mL}$  a été utilisée comme contrôle positif d'apoptose. **A)** Immunobuvardage de type Western contre la caspase-3 clivée (17-19 kDa), avec la  $\beta$ -actine (43 kDa) comme contrôle de chargement (50  $\mu\text{g}$  de protéines/puits).

**B)** Analyse de l'intensité du marquage normalisée en fonction de celle du contrôle DMSO 0,16%. Ces résultats sont préliminaires, n'ayant été fait qu'une fois ( $n=1$ ).

Puisque le  $n=1$  pour cette expérience, l'écart-type et par conséquent la significativité statistique n'ont pas pu être calculés. Il en ressort tout de même que la technique a été mise au point, suggérant une augmentation du clivage de la caspase-3 par la PPPS 0,4 mg/mL. À noter que le graphique de la Figure 9B représente les ratios du marquage de la caspase-3 clivée sur celui de la  $\beta$ -actine, normalisés en fonction du contrôle DMSO.

### ***1.33 Variation des marqueurs d'autophagie dans la lignée U-118 MG***

Le même protocole d'immunobuvardage de type *western* a été appliqué pour la détection de l'autophagie, mais cette fois, les marqueurs utilisés étaient les protéines p62 et LC3. Les résultats présentés à la Figure 10 sont, comme ceux de la Figure 9, des résultats préliminaires. En effet, l'expérience n'a pu être effectuée qu'à une reprise, sur la lignée U-118 MG, étant donné la contrainte de temps. Il n'en demeure pas moins qu'une importante augmentation de près de 9 fois pour p62 et de 6 fois pour LC3 a été observée à la suite d'un traitement de 24h à la PPPS 0,4 mg/mL. Un traitement de 1h à la bafilomycine a été employé comme contrôle de l'inhibition du processus autophagique (Kondo *et al.*, 2005; Tanida et Waguri, 2010). Il est important de mentionner que les graphiques de la Figure 10B et 10C ont été basés sur les ratios du marquage de la protéine d'intérêt sur celui de la  $\beta$ -actine. C'est pourquoi l'augmentation de LC3 vue avec la PPPS 0,4 mg/mL peut sembler contraire à ce qu'indique la Figure 10A. Bien que la variation de LC3 soit une mesure utilisée dans la littérature pour détecter une fluctuation du flux autophagique, il semble que le ratio LC3-II/LC3-I soit maintenant le paramètre le plus sensible. Ce ratio a donc été calculé et présenté à la Figure 10D. Tel que mentionné précédemment, cette technique devra être reproduite avant de pouvoir tirer des conclusions.



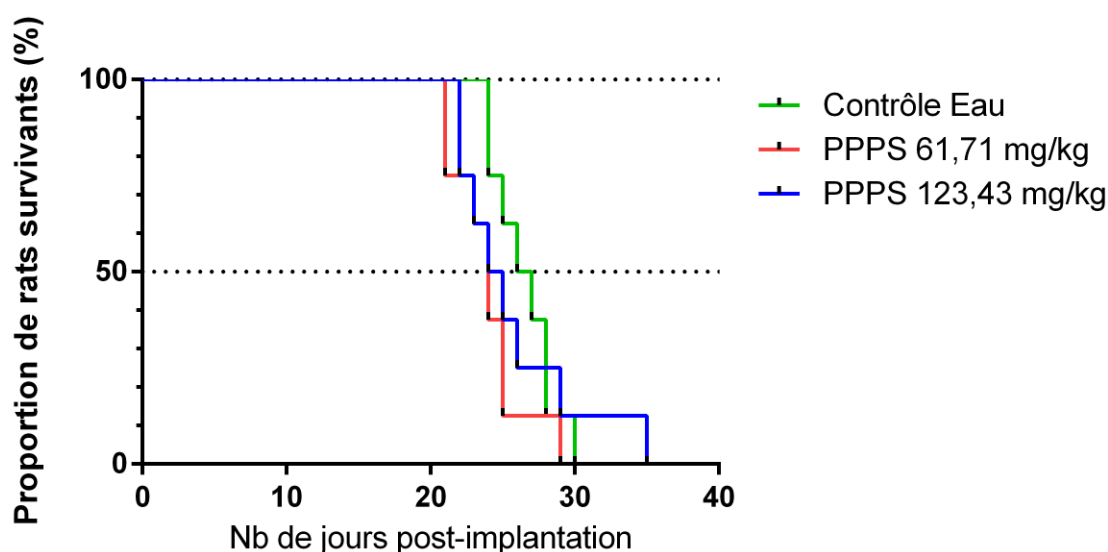
**Figure 10 : Effet d'un traitement de 24h à la PPPS sur l'expression des protéines p62 et LC3 dans les cellules U-118 MG.**

Une exposition de 1h à la bafilomycine A (10  $\mu$ g/mL) a été utilisée comme contrôle de l'inhibition de l'autophagie. **A)** Immunobuvardage de type Western contre p62 (62 kDa) et contre LC3 (16-18 kDa), avec la  $\beta$ -actine (43 kDa) comme contrôle de chargement (50  $\mu$ g de protéines/puits). **B) et C)** Analyse de l'intensité du marquage normalisée en fonction de celle du contrôle DMSO 0,16%. **D)** Ratio de l'intensité de LC3-II sur LC3-I. Ces résultats sont préliminaires, n'ayant été fait qu'une fois (n=1).

## Absence de différence significative observée dans le modèle *in vivo*

### 1.34 Survie des rats Fischer-F98

Le modèle de rats Fischer-F98, bien caractérisé dans notre laboratoire, a été utilisé pour évaluer les effets *in vivo* de la PPPS administrée sous forme aqueuse par gavage. Ainsi, les rats implantés avec les cellules F98 (syngéniques) ont été gavés avec de l'eau (groupe contrôle) ou avec de la PPPS équivalant à 3 pommes/jour (61,71 mg/kg) ou à 6 pommes/jour (123,43 mg/kg), et ce, du 10<sup>e</sup> jour post-implantation jusqu'à leur euthanasie. Lorsqu'au moins un des points limites décrits précédemment était atteint, les rats étaient euthanasiés par exsanguination et par perfusion intracardiaque de formaline 10%. C'est ainsi que notre étude de survie a été réalisée; les résultats sont présentés à la Figure 11.



**Figure 11 : Diagramme de Kaplan-Meier du modèle Fischer-F98**

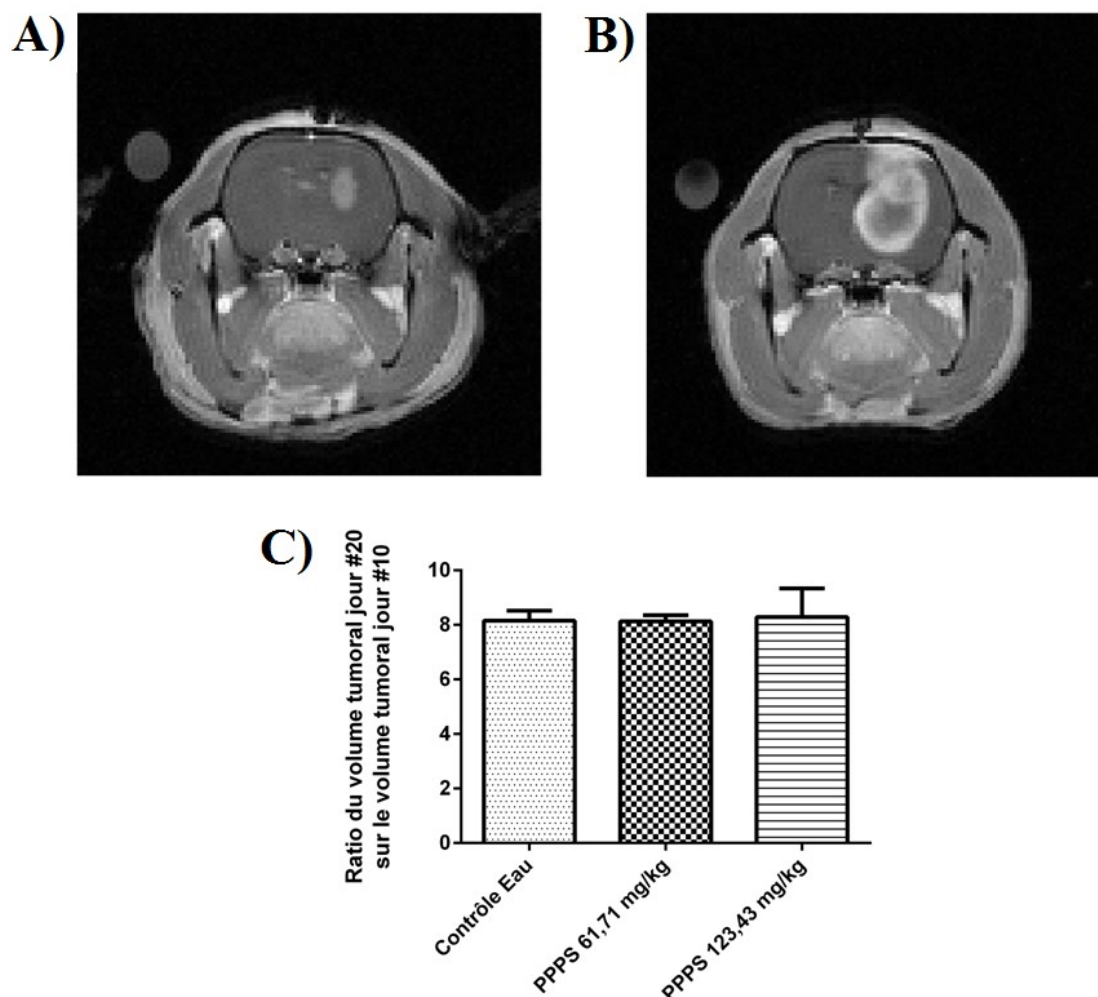
La survie des animaux des groupes gavés avec la PPPS 61,71 et 123,43 mg/kg a été comparée à celle des rats gavés avec de l'eau. Les rats (8/groupe) ont été gavés quotidiennement (10 mL/kg) du jour #10 post-implantation jusqu'à leur euthanasie. Aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'a été observée.

La survie des 8 rats par groupe est illustrée dans le diagramme de Kaplan-Meier présenté ci-haut. Le croisement de chaque courbe avec la ligne transverse en regard du 50% correspond à la survie médiane de chaque groupe. Elle est de 26 jours pour le groupe

contrôle et de 24 jours pour deux groupes traitements, ce qui n'est pas statistiquement différent selon le test du *log-rank* (ou test de Mantel-Cox).

### ***1.35 Croissance radiologique des tumeurs***

La croissance des tumeurs a été évaluée par IRM chez 3 rats par groupe, choisis de façon aléatoire. Les IRM, en pondérations T1, ont été réalisés aux jours #10 et #20. L'agent de contraste T1 Magnevist® a été employé pour rehausser la tumeur, de façon à pouvoir la différencier du parenchyme cérébral sain et de l'œdème. Les rats n'ayant pas encore été gavés au moment de l'IRM du jour #10 (les gavages ayant été débutés plus tard cette journée-là), cette imagerie servait principalement de contrôle interne de la technique. Une image représentative d'une coupe scannée 5 minutes après l'injection du contraste est montrée à la Figure 12A. Le volume tumoral au jour #10 était de  $27,36 \pm 6,68 \text{ mm}^3$ , tout groupe confondu, et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (résultats non publiés). Au jour #20, c'est-à-dire 10 jours après le début des gavages, les 3 mêmes rats pour chaque groupe ont été scannés à nouveau, avec les mêmes paramètres IRM. Un exemple d'image obtenue est présenté à la Figure 12B. Tel qu'on s'y attendait à la suite des observations de Mathieu *et al.* en 2007, la tumeur a manifestement augmenté de volume et produisait systématiquement un effet de masse. La région plus foncée au centre de la tumeur constitue le centre nécrotique caractéristique des GBM, qui ne rehausse que tardivement étant donné son manque de vascularisation. Une fois les coupes analysées avec un logiciel de segmentation fait sur mesure, les volumes tumoraux ont été calculés. Les ratios des volumes à #20 sur ceux à #10 sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type dans le graphique C. Une fois de plus, aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'a été observée.



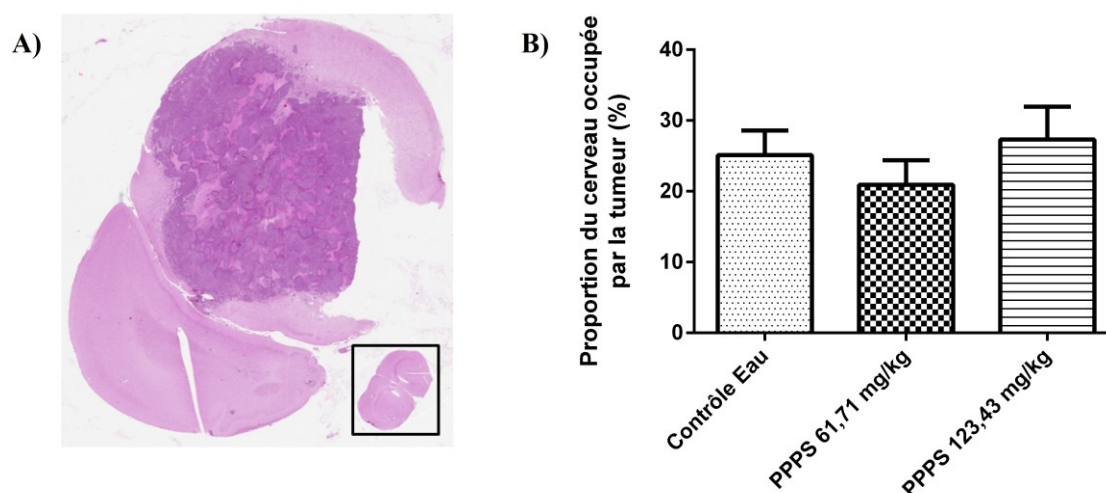
**Figure 12 : Suivi de la croissance tumorale par IRM (pondération T1).**

**A)** Image représentative d'une coupe au jour #10, 5 min après l'injection de l'agent de contraste. **B)** Image représentative d'une coupe au jour #20, 5 min après l'injection de l'agent de contraste. **C)** Analyse des images IRM, comparant le ratio du volume tumoral aux jours #20/#10 selon le traitement reçu par les rats, soit la PPPS 61,71 et 123,43 mg/mL ou l'eau. La moyenne des 3 rats/groupes (n=3) est représentée, avec l'écart-type. Aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'a été observée.

### 1.36 Taille histologique des tumeurs

En complément au suivi radiologique, la taille des tumeurs a été évaluée histologiquement. Les cellules néoplasiques ont pu être distinguées du parenchyme sain par la coloration H&E. L'image de la Figure 13A constitue une coupe typique. La proportion du cerveau

occupée par la tumeur a été calculée et représentée graphiquement en B. Les tumeurs occupent en moyenne 25,11%, 20,91% et 27,32% des cerveaux des rats respectivement gavés avec de l'eau, de la PPPS 61,71 et 123,43 mg/kg. L'ANOVA et le test de Dunnett réalisés ne démontrent aucune différence significative entre les groupes.

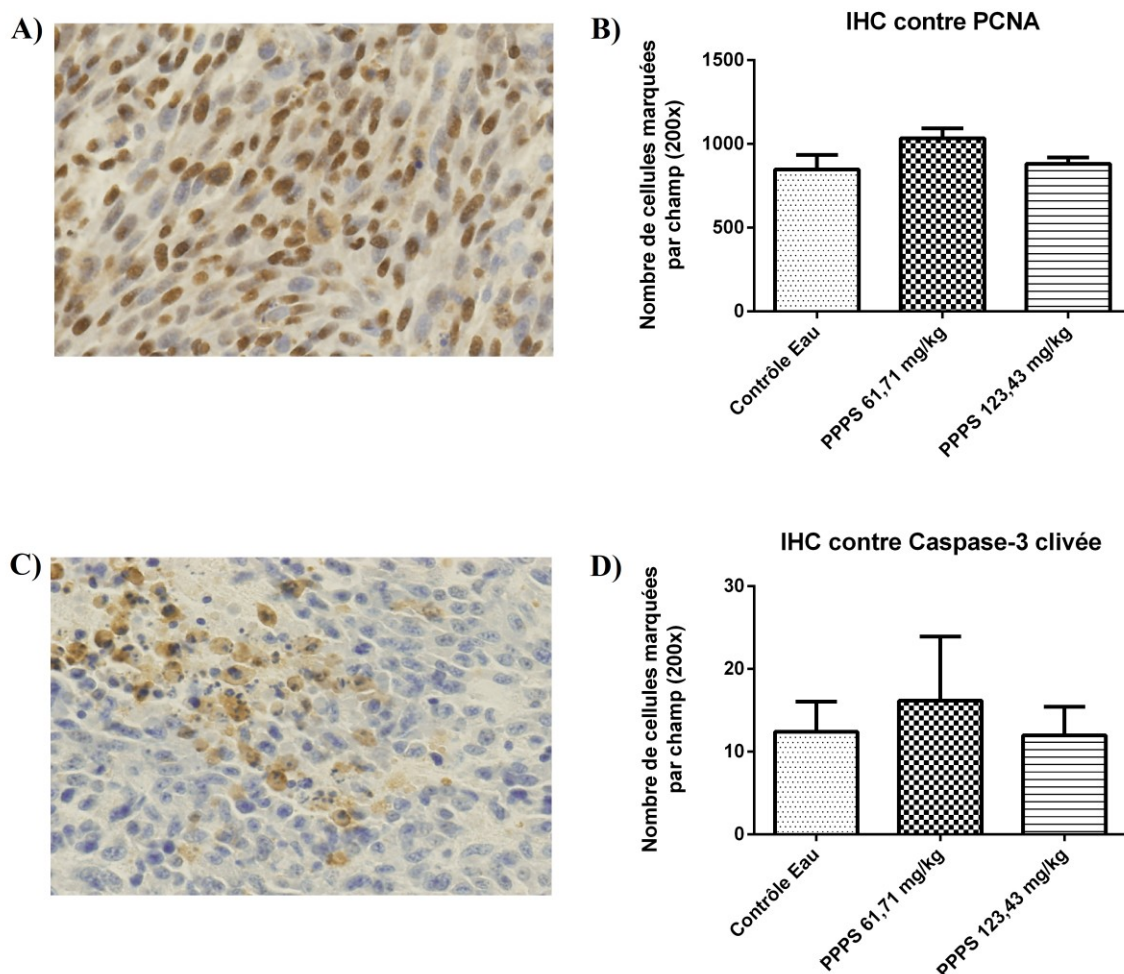


**Figure 13 : Taille tumorale évaluée par coloration H&E des cerveaux prélevés**

**A)** Image représentative d'une coupe de cerveau porteur d'une tumeur (en violet). Dans le coin inférieur droit, coupe d'un cerveau sain. **B)** Analyse de l'aire occupée par la tumeur comparée à l'aire totale du cerveau, en fonction du traitement reçu par les rats. Le cerveau des 8 rats par groupe a été analysé. Aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'a été observée.

### 1.37 Immunohistochimie contre PCNA et caspase-3 clivée

L'immunohistochimie (IHC) est une autre technique qui a été appliquée sur la région A des cerveaux prélevés. Le PCNA, qui est un indice de prolifération cellulaire, a été tout d'abord marqué, tel que vu à la Figure 14A. À l'instar de l'analyse des coupes colorées avec H&E, le nombre de cellules marquées par IHC a été analysée de manière informatisée. 5 images de chaque cerveau, ciblant la région active (non nécrotique) de la tumeur, ont été ainsi analysées, et les résultats sont résumés à la Figure 14B. Le même anticorps contre la caspase-3 clivée a été utilisé pour l'IHC illustré en C. Que ce soit pour l'IHC contre PCNA (C) ou contre la caspase-3 clivée (D), aucune différence n'a été décelée. Il est à noter qu'aucun marquage n'a été observé sur les lames de contrôle négatif (résultats non montrés).



**Figure 14 : Colorations immunohistochimiques contre les marqueurs PCNA et caspase-3 clivée**

**A) et C)** Coupes représentatives des IHC contre PCNA (A) et contre la caspase-3 clivée (C), réalisées sur les spécimens cérébraux (grossissement 200x) dont les noyaux ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline de Harris. **B) et D)** Comparaison du nombre de cellules exprimant PCNA et la caspase-3 clivée selon le traitement reçu. Pour chaque cerveau, 5 images ne contenant que de la tumeur active ont été analysées. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Aucune différence significative n'a été observée.



## DISCUSSION

Malgré une trentaine d'années de recherche en neuro-oncologie et la combinaison de plusieurs modalités de traitement, le pronostic des patients atteints de GBM demeure très réservé. Or, de nombreux effets antinéoplasiques ont été observés sur une multitude de lignées cellulaires suite à une exposition à des produits à base de pomme. Parmi ces effets, on retrouve l'induction de la mort cellulaire, notamment par apoptose, ainsi que l'inhibition de la prolifération et de l'invasion cellulaire. Un résumé de ces effets est présenté dans le Tableau 1 de ce travail. D'un point de vue *in vivo*, deux études se démarquent des autres par le fait qu'elles ont recherché le potentiel thérapeutique de la pomme sur le cancer. Les animaux de ces études ont développé des tumeurs sous-cutanées suite à l'implantation de cellules d'hépatome (Miura *et al.*, 2007), de carcinome mammaire et de mélanome (Miura *et al.*, 2008). Dans les trois types de cancers, la croissance des tumeurs était significativement moindre dans les groupes ayant reçu un traitement *per os* à base de pomme. Le nombre de métastases à distance était également réduit (Miura *et al.*, 2007), et le taux de survie des souris présentant des mélanomes a été augmenté par le traitement (Miura *et al.*, 2008).

Cependant, les effets de la pomme sur les gliomes malins sont peu connus. Une seule étude a exploité la pomme dans son intégralité pour étudier les propriétés antiprolifératives sur une lignée cellulaire de GBM (Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Quelques autres groupes de recherche se sont concentrés sur l'influence de la quercétine sur les GBM *in vitro* (Braganhol *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2010; Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013). Dans tous les cas, les résultats suggèrent de puissants effets antinéoplasiques.

Dans ce contexte, l'évaluation du potentiel thérapeutique de la pelure de pomme sur les GBM apparaissait intéressante. Nous avons donc conçu la présente étude, qui comportait un volet *in vitro* où 3 lignées de cellules gliales malignes ont été exposées à la PPPS, ainsi qu'un volet *in vivo* sur le modèle de rats Fischer-F98 gavés avec la PPPS. Malgré des effets très prometteurs sur les cellules F98, U-118 MG et U-87 MG, aucune différence

significative n'a été observée entre les rats traités avec la PPPS et les rats du groupe contrôle.

Avant de discuter de façon plus exhaustive des résultats obtenus, certaines précisions méthodologiques doivent être apportées. Tout d'abord, quoique le but était d'évaluer le potentiel pharmacologique de la PPPS, cette étude ne respecte pas la démarche pharmacologique traditionnelle. En effet, la synergie observée par Kern *et al.* en 2005 puis par Veeriah *et al.* en 2007 dictait l'emploi de la pelure de pomme sous sa forme la plus entière possible. Le fait d'étudier plusieurs molécules simultanément complique grandement la recherche d'effets thérapeutiques, d'autant plus que ces molécules interagissent entre elles. Néanmoins, l'extraction d'une ou de plusieurs composantes de la pelure de pomme est à éviter, puisque les effets risqueraient d'être amoindris. Bien entendu, certains pourraient soulever la possibilité d'amplifier les effets, dans le cas où l'extraction séparerait des antagonistes ou des inhibiteurs. Pour l'instant, une telle situation n'a toutefois jamais été décrite. C'est pourquoi plusieurs auteurs choisissent la solubilisation de la pomme dans sa forme la plus entière.

Ceci dit, le choix du véhicule devient alors particulièrement important. En effet, même s'il est utopique de penser qu'un même solvant puisse solubiliser toutes les molécules contenues dans la pomme, le choix d'un solvant polyvalent, compatible à la fois avec des composés lipophiles et hydrophiles, s'imposait. Un solvant amphipathique tel que le DMSO était donc approprié (Santos *et al.*, 2003). Parmi les études *in vitro* ayant eu recours à un véhicule pour solubiliser leur préparation, deux ont utilisé le DMSO (Maldonado-Celis *et al.*, 2008; Pierini *et al.*, 2008). La concentration finale était de 0,1%, ce qui est adéquat vu que le DMSO peut lui-même engendrer des effets cellulaires à une concentration  $\geq 1\%$  (Santos *et al.*, 2003). Voilà donc les raisons qui ont guidé notre choix vers le DMSO (à une concentration maximale de 0,16%) comme solvant pour notre PPPS.

Lors de l'élaboration de notre protocole *in vivo*, nous avons cependant été confrontés au fait que les études animales étaient toutes réalisées avec l'eau comme véhicule (Ding *et al.*, 2004; Shoji *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005, 2009, 2010; Gossé *et al.*, 2005; Miura *et al.*,

2008). De prime abord, le changement de solvant entre les volets *in vitro* et *in vivo* de notre étude pouvait sembler peu stratégique. Pourtant, dans le contexte d'une étude exploratoire, le plus logique était d'employer les méthodes ayant déjà été démontré efficaces. C'est ainsi que nous avons choisi l'eau comme véhicule pour nos solutions de gavage.

Pour la partie *in vivo* de notre étude, la voie d'administration *per os* a été choisie pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la facilité associée à cette approche rendait cette option très commode, en ce sens que si la PPPS administrée par voie orale avait engendré les effets escomptés, ce mode d'administration aurait certainement été privilégié lors de la transposition en clinique. Encore une fois, c'est en se basant sur la nature exploratoire de notre projet que nous avons préféré commencer avec les méthodes ayant déjà fait leurs preuves (Miura *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2008).

Maintenant que ces précisions méthodologiques ont été apportées, les résultats obtenus seront discutés. L'évaluation colorimétrique de la transformation du WST-1 est un test fréquemment utilisé en début d'étude pour explorer sommairement le potentiel d'une molécule. Ce test rapide reflète plusieurs phénomènes cellulaires, c'est pourquoi il est souvent considéré comme un test de survie ou de prolifération cellulaire.

Ainsi, nous avons exposé les lignées cellulaires F98, U-118 MG et U-87 MG à des concentrations de PPPS de 0,1 et 0,4 mg/mL, durant 48, 72 ou 96h. Puisque la PPPS était solubilisée dans du DMSO, la concentration maximale de ce solvant, soit 0,16%, a été utilisée comme traitement de contrôle. Comme le démontre de façon éloquent la Figure 3, les trois lignées ont grandement été affectées par le traitement à la PPPS 0,4 mg/mL et, dans une moindre mesure, à la PPPS 0,1 mg/mL. Les effets observés semblent survenir dès les 48 premières heures de traitement, puisque les résultats obtenus suite aux trois temps de traitement sont assez similaires, du moins pour les cellules U-118 MG et U-87 MG. L'augmentation de la transformation du WST-1 par les F98 suite à un traitement de 48h à la PPPS 0,1 mg/mL était quelque peu inattendue. Toutefois, vu l'importance des écarts-types dans le graphique de cette lignée, il est possible que cet effet soit dû à l'erreur intrinsèque de la technique de décompte cellulaire pré-ensemencement. En effet, étant donné que les

F98 ont une très grande vitesse de réplication, même une petite différence dans le nombre de cellulesensemencées entre les puits peut engendrer un biais 48h plus tard. Par ailleurs, aucun article dans la littérature n'a indiqué que la pomme ou ses dérivés avait le potentiel de stimuler le métabolisme ou la prolifération cellulaire.

En outre, nous avons observé chaque puits au microscope avant l'ajout du WST-1 (résultats non montrés), de manière à pouvoir corréler ces observations aux résultats colorimétriques. Les cellules traitées avec la PPPS 0,4 mg/mL, qui étaient nettement moins nombreuses que dans les puits contrôles, présentaient une morphologie arrondie et flottaient dans le milieu de culture. Cette présentation était identique à celle suivant un traitement de cisplatine. Ainsi, la PPPS semblait visuellement avoir un effet cytotoxique et/ou antiprolifératif. Il est à noter qu'aucune différence flagrante n'a été observée entre les cellules F98 traitées 48h à la PPPS 0,1 mg/mL et celles traitées au DMSO.

Bien que les résultats du test au WST-1 ne renseignent aucunement sur les mécanismes induits par le traitement à la PPPS, il suggère que celle-ci possède des propriétés anticancéreuses. Bien entendu, d'autres expérimentations étaient nécessaires pour préciser ces propriétés. Une inhibition de la prolifération, une induction de mort cellulaire ou un ralentissement du métabolisme chez des cellules encore viables pouvaient tous engendrer les résultats obtenus. Or, ces effets ont tous déjà été observés par le passé sur d'autres lignées cancéreuses, tel que le résume le Tableau 1. Maintenant, quels mécanismes cellulaires pouvaient être impliqués? Il serait très difficile de tenter de répondre en se basant sur ce test seulement. Les hypothèses seront donc formulées plus loin.

Les GBM sont reconnus pour être des tumeurs particulièrement invasives (Louis, 2006; Ricard *et al.*, 2012). Cette caractéristique constitue donc une cible pharmacologique intéressante. Pour les tests d'invasion, nous avons eu recours à des sphéroïdes. Ceux-ci sont utiles non seulement à cause de leur croissance tridimensionnelle, mais également parce que le phénotype des cellules cultivées en 3D semble plus près de la réalité *in vivo* (Friedrich *et al.*, 2009). Avant d'aller plus loin, il est important d'expliquer la différence entre les sphéroïdes et les neurosphères. En effet, avec le nombre croissant d'articles en lien

avec la théorie des cellules cancéreuses à caractéristiques de cellules souches (*stem-like cancer cells*) (Wen et Kesari, 2008; Nduom *et al.*, 2012; Ricard *et al.*, 2012), le terme *neurosphère* est de plus en plus présent dans la littérature et pourrait être facilement confondu avec celui de *sphéroïde*. Bien que les deux correspondent à des modes de culture 3D, les neurosphères sont formés de cellules survivant à l'absence de sérum dans le milieu, et sont réputés pour être enrichis en cellules indifférenciées (Rietze et Reynolds, 2006). Les sphéroïdes, eux, réfèrent à des cellules qui croissent sous forme de sphères en présence de facteurs de croissance, sans qu'une sélection cellulaire n'ait été faite. Étant donné que des expérimentations antérieures réalisées dans notre laboratoire avaient révélées que les cellules U-118 MG ne pouvaient pas croître sous forme de sphéroïdes (résultats non publiés), cette lignée cellulaire n'a pas été incluse dans notre étude.

Pour modéliser la grande capacité infiltrative des gliomes malins, nous avons choisi d'implanter des sphéroïdes de cellules F98 et U-87 MG dans une matrice pour ainsi suivre leur progression en 3D. La matrice extracellulaire au niveau cérébral diffère de celle des autres tissus en étant principalement constituée d'acide hyaluronique, de protéoglycanes, de tenascine-C et de thrombospondine (Bellail *et al.*, 2004). Étant naturellement très hydratée et contenant peu de collagène, elle est réputée pour être difficile à étudier. Cependant, il a été démontré que les espaces périvasculaires cérébraux sont riches en collagène de type IV (Vehlow et Cordes, 2013), et que l'infiltration des gliomes se fait préférentiellement en suivant les fibres de la matière blanche et les vaisseaux sanguins (Pedersen *et al.*, 1993). C'est donc à défaut d'avoir une matrice parfaitement représentative de l'interstice cérébral que nous avons choisi d'utiliser une matrice à base de laminine, de collagène de type IV, de protéoglycanes (héparan-sulfate) et d'entactine. En outre, puisque les facteurs trophiques des cellules gliales ne sont pas encore bien connus, la réactivité de la matrice employée est difficilement évaluable (Vehlow et Cordes, 2013). C'est pourquoi nous avons interprété la progression des sphéroïdes comme étant un modèle d'invasion tridimensionnelle, sans nous prononcer sur l'interaction cellulaire avec la matrice.

La solution de traitement à base de PPPS ou de DMSO était mélangée directement au moment de sa préparation, permettant ainsi un milieu de traitement homogène. Suite à

l'implantation, les sphéroïdes étaient photographiés à toutes les 24h afin de suivre leur prolifération et l'invasion. Après 24h, les sphéroïdes de F98 exposés à la PPPS 0,24 mg/mL étaient significativement plus petits que les sphéroïdes contrôles. À partir de 48h de traitement, les 2 concentrations plus élevées de PPPS utilisées, soit 0,12 et 0,24 mg/mL, avaient inhibé la croissance des sphéroïdes.

Le même protocole a été appliqué avec les sphéroïdes de cellules U-87 MG, qui présentent un caractère plus invasif que ceux de F98. Des résultats semblables ont été obtenus, du moins d'un point de vue qualitatif, puisque la quantification n'a pu être effectuée pour les raisons mentionnées précédemment. L'invasion cellulaire est clairement inhibée par la PPPS, et ce, de manière encore plus marquée lorsque la concentration de PPPS augmente.

L'inhibition de l'invasion et de la migration cellulaire avait déjà été observée sur des cellules d'hépatome (Miura *et al.*, 2007), de cancer du côlon (Psahoulia *et al.*, 2007) et de GBM (Michaud-Levesque *et al.*, 2012). Dans la première étude, les polyphénols extraits de la pomme ont significativement diminué la prolifération et la migration des cellules AH109A dans leur modèle *in vitro* et *in vivo*, où l'extrait administré *per os* réduisait les métastases. La deuxième étude, portant sur le cancer du côlon, a démontré une inhibition de la migration des 2 lignées cellulaires utilisées (HT-29 et DLD-1) suite à un traitement à la quercétine. La troisième étude, quant à elle, a observé que la quercétine induisait une diminution de la signalisation via IL-6 et STAT3 dans les cellules T98G et U-87 MG, provoquant ainsi une diminution de la migration *in vitro*.

Or, les auteurs de cette dernière étude indiquent que la quercétine réduit le recrutement de STAT3 auprès du promoteur de 2 gènes cibles modulés par STAT3, soit la MMP-2 et la cycline D1. La MMP-2 est reconnue pour jouer un rôle important dans la capacité des gliomes à dégrader la matrice pour envahir, tout comme la MMP-9 (Wang *et al.*, 2003). Il a été démontré par un autre groupe que l'activation de la MMP-9 dans les cellules U-87 MG pouvait être bloquée par la présence d'antioxydants (Chiu *et al.*, 2010). Étant donné le grand potentiel antioxydant de la pelure de pomme (Eberhardt *et al.*, 2000; Boyer et Liu,

2004), il est possible que ce soit par ce mécanisme que notre PPPS a réduit le caractère invasif des U-87 MG.

Parmi les autres mécanismes proposés dans la littérature, on retrouve la possible surexpression de la maspine par les polyphénols dans les cellules de cancers prostatique (22Rv1 et DU145) et mammaire (Mcf-7 et Mcf-7:Her18) (Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Notons que la maspine est un important suppresseur de tumeur ayant des propriétés anti-métastatiques et anti-angiogéniques. Finalement, l'inhibition de l'invasion peut faire partie de processus intracellulaires résultant d'un mécanisme moins spécifique, tel que l'inhibition de l'EGFR (Kern *et al.*, 2005), de la voie PI3K/Akt (He *et al.*, 2012) ou de NF- $\kappa$ B (Yoon et Liu, 2008).

Outre via le suivi de la croissance des sphéroïdes, la prolifération cellulaire a aussi été étudiée par cytométrie en flux. En effet, en utilisant de façon concomitante une RNase et un marqueur fluorescent, tel le PI, qui se lie de façon stœchiométrique aux acides nucléiques, le contenu en ADN peut être utilisé pour déterminer dans quelle phase du cycle se trouve une cellule. Rappelons que les cellules quiescentes (non prolifératives) sont dites en phase G0 (Kumar *et al.*, 2005). Lorsqu'une cellule veut se diviser, elle entre dans la phase G1. Au cours de cette première étape, la cellule augmente son métabolisme cellulaire et produit la machinerie cellulaire nécessaire. Lors de la phase S, l'ADN de la cellule est dupliqué. Durant la phase G2, la cellule croît rapidement et poursuit sa synthèse protéique, en préparation à la dernière étape. Finalement, la phase M correspond à la mitose, c'est-à-dire la division cellulaire en deux cellules identiques. Ainsi, en se concentrant sur le contenu en ADN, les cellules autosomales diploïdes (2n) sont considérées être dans les phases G0 ou G1, alors que les cellules tétraploïdes (4n) sont vraisemblablement dans la phase G2 ou au début de M. Lors de la phase S, le processus de réplication engendre une quantité variable d'ADN.

C'est en se basant sur ces principes théoriques que les données de la Figure 10 ont été calculées. Ainsi, il semble que les cellules F98 et U-118 MG aient été influencées de manière similaire par les traitements de PPPS. En effet, après une exposition de 24h à la

plus haute concentration, la proportion des cellules en phase S a été diminuée dans ces deux lignées. Dans le cas des F98, la réduction (de presque la moitié) était statistiquement significative, alors qu'il s'agissait d'une tendance pour les U-118 MG. Aucune différence n'a été observée pour les autres phases du cycle cellulaire (résultats non montrés), tout comme avec les cellules U-87 MG. Puisque la phase S correspond à la phase de réplication de l'ADN, ces résultats suggèrent une inhibition de la prolifération par la PPPS sur les F98.

Plusieurs études avaient déjà observé la capacité des produits de la pomme à moduler le cycle cellulaire. Cependant, c'est surtout une accumulation des cellules en phase G0/G1 qui avait été démontrée, notamment sur les cellules Mcf-7 et DU145 (Reagan-Shaw *et al.*, 2010), OE-33 et OE-19 (Pierini *et al.*, 2008) et ACC-M (Zheng *et al.*, 2013). Une augmentation du ratio G1/S avait également été observée sur les cellules MDA-MB-231 (Sun et Liu, 2008). L'article de 2005 de Gossé *et al.* mentionne une augmentation des cellules SW620 en G2/M suite à l'exposition à des polyphénols de pomme. L'étude de Miura *et al.* publiée en 2007 suggère une inhibition de la phase S, puisque les cellules AH109A ont incorporé significativement moins de thymidine radiomarquée après l'exposition aux polyphénols de pomme. Une seule étude a indiqué des changements quelque peu contraires aux autres, avec une augmentation des cellules en phase S et une diminution de la proportion en G1 sur des cellules DLD-1 traitées avec la quercétine (Psahoulia *et al.*, 2007).

De prime abord, il peut être surprenant qu'en réponse à la réduction de cellules en phase S, nous n'ayons pas noté d'accumulation de cellules dans les autres phases. Or, étant donné la multitude d'effets décrits dans la littérature et la variété de composés dans notre PPPS, il est possible que ce que nous avons observé soit le reflet d'un double arrêt du cycle cellulaire, par exemple en G1 et en G2/M. Cette dualité pourrait expliquer pourquoi G1 ou G2/M, prises séparément, ne se démarquent pas du contrôle.

Tous ces phénomènes sur le cycle peuvent impliquer plusieurs voies intracellulaires. Tel que mentionné dans la section précédente, la cycline D1 semble être moins exprimée dans les cellules de GBM T98G et U-87 MG traitées avec la quercétine (Michaud-Levesque



*et al.*, 2012). Elle et son partenaire Cdk4 paraissent aussi diminués dans les cellules de carcinome mammaire Mcf-7 et MDA-MB-231 en présence d'extraits de pomme (Sun et Liu, 2008). Selon les auteurs, cet effet serait secondaire à l'inhibition du facteur NF- $\kappa$ B. D'ailleurs, un autre groupe a conjecturé que l'acide 2 $\alpha$ -hydroxyursolique extrait de la pomme inhibait la prolifération cellulaire via l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B. Cette hypothèse est intéressante, particulièrement du fait que NF- $\kappa$ B est souvent activé de façon constitutive dans les GBM (Nagai *et al.*, 2002).

Finalement, les cellules HT-29, provenant d'un cancer colorectal, prolifèrent moins lorsqu'elles sont exposées à un extrait de polyphénols de pomme (Kern *et al.*, 2005), ce qui semble résulter de l'inhibition de l'EGFR et de la voie de signalisation qui en découle. Dans notre contexte, l'implication de cette voie est d'autant plus plausible que l'EGFR est surexprimé dans 60% des GBM (Hegi *et al.*, 2012).

Le protocole de cytométrie en flux, permettant l'étude du cycle cellulaire, était particulièrement intéressant, en ce sens qu'il rendait également possible la détection de cellules apoptotiques. En effet, tel qu'expliqué précédemment, l'ADN subit une fragmentation organisée lors du phénomène apoptotique. Par conséquent, lors du marquage de l'ADN avec le PI, des fragments peuvent sortir de la cellule, la rendant ainsi hypodiploïde (Riccardi et Nicoletti, 2006). Cette méthode est fréquemment utilisée pour détecter l'apoptose (Sun et Liu, 2008; Reagan-Shaw *et al.*, 2010). Étant donné que la résistance à l'apoptose est une caractéristique importante des cancers, particulièrement des GBM, l'évaluation du potentiel anti-apoptotique de la PPPS s'imposait.

Nous avons donc analysé les résultats obtenus par cytométrie en flux de manière à quantifier la proportion de cellules en apoptose. Dans les trois lignées cellulaires, la quantité relative de cellules hypodiploïdes a significativement augmenté suite à une exposition de 24h à la PPPS 0,4 mg/mL. Ceci porte à croire que la PPPS possède des propriétés pro-apoptotiques.

Pour confirmer ce résultat, nous avons eu recours à une autre méthode couramment employée pour détecter l'apoptose, soit le dosage de la forme activée des caspases effectrices, telles que la caspase-3 (Gossé *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Maldonado-Celis *et al.*, 2009). Pour ce faire, nous avons procédé à l'immunobuvardage de type *western* sur les lysats cellulaires, en ciblant la forme clivée (activée) de la caspase-3. Bien que réalisé à une seule reprise, la caspase-3 clivée semble être légèrement augmentée avec le traitement de PPPS 0,4 mg/mL. Toutefois, cette expérimentation doit être répétée pour établir la significativité statistique.

L'augmentation des cellules hypodiploïdes et la possible activation de la caspase-3 suggèrent l'induction de l'apoptose par la PPPS. Plusieurs groupes de recherche travaillant sur d'autres types de cellules cancéreuses sont d'ailleurs arrivés à cette même conclusion, que ce soit avec des polyphénols de pomme (Gossé *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2008; Pierini *et al.*, 2008; Maldonado-Celis *et al.*, 2009) ou avec la quercétine (Braganhol *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013).

Pour expliquer ce phénomène, plusieurs mécanismes ont été proposés. Avant de poursuivre, il est important de préciser que l'apoptose survient principalement via 2 voies distinctes convergeant vers une finalité commune. Une de ces voies est appelée *extrinsèque*, puisqu'elle implique un signal apoptotique extérieur à la cellule (Delbridge *et al.*, 2012). L'autre voie, qualifiée d'*intrinsèque*, résulte plutôt d'un événement intra-cellulaire déclenché par une perte de polarisation de la membrane mitochondriale et par la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme (Delbridge *et al.*, 2012). Dans les deux cas, le suicide de la cellule découle de l'activation de caspases effectrices telles les caspases-3, 6 et 7.

Dans la littérature, les effets des produits de la pomme décrits ci-haut semblent souvent en lien avec l'induction de la voie intrinsèque, que ce soit par des extraits de pomme (Miura *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013) ou par la quercétine (Braganhol *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013). Bien que les auteurs de ces études aient peu élaboré sur les voies de signalisation impliquées, il est possible que le potentiel antioxydant réduise les

dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et, par conséquent des dommages mitochondriaux (Eberhardt *et al.*, 2000; Boyer et Liu, 2004).

L'implication de la voie de ERK dans la modulation de l'apoptose par les produits provenant de la pomme a également été proposée. Cette voie peut promouvoir l'un ou l'autre des types d'apoptose (Cagnol et Chambard, 2010). Selon l'article de Gossé *et al.* publié en 2005, les polyphénols pourraient stimuler cette voie.

Une autre cible possible est la survivine. En effet, cet inhibiteur de l'apoptose, souvent surexprimé dans les cancers, semble modulé à la baisse par un traitement à la quercétine dans les cellules A172 de GBM (Kim *et al.*, 2008). Finalement, le groupe de Maldonado-Celis a soulevé en 2009 la possibilité que la voie extrinsèque soit activée par les procyanidines via le récepteur membranaire TRAIL.

Au cours des dix dernières années, le nombre d'articles portant sur l'autophagie s'est accru de manière fulgurante. Ce phénomène cellulaire réfère à la dégradation dynamique de composantes intracellulaires, survenant lors du recyclage d'organites ou de protéines altérés, ou en réponse à un stress important (Rubinsztein *et al.*, 2007). Ceci se produit au sein de vacuoles, appelées autophagosomes, qui séquestrent les composantes intracellulaires jusqu'à ce que la fusion avec un lysosome permette leur dégradation (Tanida et Waguri, 2010). Selon les circonstances, l'autophagie peut engendrer des conséquences bien différentes (Levine et Kroemer, 2008). À court terme, elle peut permettre à la cellule de survivre lors de stress tels que l'hypoxie et le jeûne. Cependant, elle peut mener à la mort de la cellule à plus long terme. C'est pourquoi le rôle de l'autophagie dans le cancer demeure imprécis (Kondo *et al.*, 2005).

Il en est de même en neuro-oncologie. D'une part, une étude a démontré que l'autophagie pouvait promouvoir la survie cellulaire dans les gliomes (Fan et Weiss, 2011). D'autre part, des inducteurs d'autophagie semblent inhiber la croissance des glioblastomes (Arcella *et al.*, 2013) et font présentement l'objet d'études cliniques (Galanis *et al.*, 2005; See et Gilbert, 2007).

Bien que l'autophagie soit considérée comme étant le 2<sup>e</sup> type de mort cellulaire programmée, l'association entre l'induction de l'autophagie et la mort cellulaire n'est pas toujours claire (Kondo *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été démontré que ce phénomène peut être associé à des mécanismes de résistance à la chimiothérapie (Moore, 2008; Moreau *et al.*, 2010), et que l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie entraînait une radiosensibilisation des cellules GBM (Ito *et al.*, 2005; Lomonaco *et al.*, 2009).

Comme l'autophagie constitue une cible potentielle dans le traitement des tumeurs cérébrales (Kaza *et al.*, 2012), nous avons investigué brièvement les effets potentiels de la PPPS. Pour ce faire, nous avons choisi de doser deux marqueurs apoptotiques par immunobuvardage de type *western*. La protéine p62 est une protéine adaptatrice impliquée dans l'assemblage des autophagosomes. Il est reconnu qu'une augmentation de la concentration cellulaire de p62 reflète une altération dans le processus autophagique (Tanida et Waguri, 2010). La protéine *light chain 3* (LC3), quant à elle, s'associe aux microtubules pour permettre la formation des autophagosomes. Elle est modifiée de façon post-traductionnelle en deux formes : LC3-I et LC3-II. Cette dernière étant dégradée par les enzymes lysosomales suite à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, une accumulation de LC3 suggère que l'autophagie est bloquée (Tanida et Waguri, 2010). Or, il semble qu'une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I serait encore plus sensible pour détecter une activation de l'autophagie (Karim *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous avons présenté nos résultats sous forme de dosage de LC3 normalisé en fonction du contrôle DMSO, et de ratio LC3-II/LC3-I.

La Figure 10 illustre l'augmentation des marqueurs p62 et LC3 dans les cellules U-118 MG suite à une exposition de 24h à la PPPS 0,4 mg/mL, suggérant ainsi une inhibition de l'autophagie. Par contre, les données du graphique de la Figure 10D concordent plus ou moins avec cette hypothèse. En effet, en admettant que la variation du ratio n'est pas seulement due au hasard, elle suggérerait une inhibition de l'autophagie par de faibles doses de PPPS, puis un rétablissement du flot autophagique par des doses croissantes de PPPS. Cela vient donc complexifier l'interprétation des immunobuvardages contre les marqueurs p62 et LC3. Bien entendu, il serait peu prudent de tirer des conclusions des résultats

préliminaires (n=1). Ainsi, malgré des résultats contradictoires, la poursuite de l'évaluation de la modulation de l'autophagie par la PPPS nous paraît toujours pertinente. Si ce que nous avons observé (en 10B et 10C) se confirmait, un nouveau mécanisme d'induction d'apoptose pourrait s'ajouter à nos hypothèses. En effet, certaines évidences scientifiques tendent à démontrer que l'inhibition de l'autophagie peut induire l'apoptose (Boya *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2005).

Jusqu'à maintenant, peu d'articles portent sur l'impact des produits de la pomme sur l'autophagie. En fait, les deux articles trouvés concernent les effets de la quercétine. D'une part, cette molécule semble induire l'autophagie dans les cellules de cancer du côlon (Psahoulia *et al.*, 2007), alors que d'autre part, aucune différence sur ce processus n'a été observée sur des cellules de GBM (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013).

Quelques mécanismes peuvent expliquer nos résultats préliminaires. Puisque l'autophagie est induite lors d'un stress oxydatif (Kaza *et al.*, 2012), et que la pelure de pomme présente un grand potentiel antioxydant (Eberhardt *et al.*, 2000; Boyer et Liu, 2004), l'inhibition de l'autophagie pourrait être expliquée par cette propriété.

Par ailleurs, une étude récente a démontré que les triterpénoïdes extraits de la pelure de pomme activent la voie de signalisation PI3K/Akt dans les cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 (He *et al.*, 2012). Or, cette voie est connue pour activer la protéine mTOR (un puissant inhibiteur de l'autophagie), tout en inhibant la voie ERK 1/2, ce qui entraîne une puissante inhibition de ce processus cellulaire (Kondo *et al.*, 2005).

Enfin, le modèle de rats Fischer-F98 a été utilisé pour évaluer les effets *in vivo* de la PPPS, étant donné qu'il a été bien caractérisé dans notre laboratoire (Mathieu *et al.*, 2007). De plus, les cellules F98 étant syngéniques aux rats Fischer, ce modèle a l'avantage d'être immunocompétent. À partir du 10<sup>e</sup> jour post-implantation, les rats ont été gavés quotidiennement avec soit de l'eau (groupe contrôle), soit de la PPPS (groupes traités). Les deux concentrations de PPPS utilisées, 61,71 et 123,43 mg/kg, ont été calculées de manière à représenter respectivement l'équivalent de 3 et 6 pommes par jour pour un humain de

70 kg. De tels calculs d'équivalence étaient déjà dans la littérature scientifique (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009), et 3 études animales antérieures avaient administré des traitements équivalant à 3 et 6 pommes par jour. 3 des 8 rats de chaque groupe ont subi un IRM cérébral aux 10<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> jours post-implantation, de façon à suivre la croissance tumorale. Lorsqu'au moins un des points limites étaient atteints, les rats étaient euthanasiés, et leur cerveau prélevé pour des études histologiques et immunohistochimiques.

Dans toutes les expérimentations animales, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. Tel que décrit dans l'étude de Mathieu *et al.* de 2007, la survie médiane des rats était de 26 jours suite à l'implantation. Les gavages ont bien été tolérés par les rats et n'ont amené aucun événement indésirable. Il est donc raisonnable de croire que notre PPPS, aux doses utilisées, n'est pas toxique. Toutefois, la PPPS *per os* semble n'avoir eu aucun impact sur la croissance tumorale, ni sur l'expression de PCNA et de caspase-3 clivée au niveau du cerveau.

Les résultats obtenus *in vitro* et la recension des écrits étaient pourtant encourageants. En effet, 2 études avaient observé des effets très prometteurs chez des animaux porteurs de tumeurs, qui étaient également traités avec des extraits de pomme par voie orale (Miura *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2008). Bien qu'il soit difficile de le prouver, la littérature laisse croire que notre PPPS pouvait être absorbée suffisamment pour produire des effets dans un organisme vivant. Toutefois, une différence majeure existe entre notre étude *in vivo* et les deux sus-mentionnées : la BHE. Puisque les tumeurs des autres groupes étaient injectées en sous-cutané, l'acheminement de leur traitement n'était pas entravé par le puissant filtre qu'est la BHE. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est le fait qu'il n'existe qu'un seul article portant sur la capacité des composés la pomme (les anthocyanidines) à s'accumuler dans le parenchyme cérébral, et c'était chez le cochon (Kalt *et al.*, 2008). Dans les circonstances, il est donc probable que la BHE, incluant les pompes à efflux, soit à l'origine de l'insuccès de notre traitement. La confirmation de cette hypothèse s'avère difficile, puisque la pléiade de molécules incluses dans la pelure de pomme complique leur

dosage au-delà de la BHE. Par conséquent, l'exploration d'autres avenues est à envisager pour la continuation de notre projet.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude sont intéressants à plusieurs points de vue. D'une part, le volet *in vitro* a permis de confirmer l'inhibition du métabolisme cellulaire, l'induction de l'apoptose et la diminution de l'invasion déjà observées antérieurement dans la littérature. D'autre part, nous avons réalisé la première étude animale portant sur les effets de la pomme sur des gliomes malins. Par conséquent, notre projet a contribué à l'avancement de la recherche dans le domaine de la pharmacologie de la pomme et de la neuro-oncologie.

Bien entendu, certains aspects de notre projet auraient avantage à être complétés ou approfondis davantage, tels que les immunobuvardages et l'investigation plus exhaustive sur l'autophagie.

De plus, comme le démontre la différence entre les résultats obtenus aux niveaux cellulaire et animal, il reste encore plusieurs étapes avant d'envisager la transposition vers la clinique. Tout d'abord, bien que la PPPS semble avoir plusieurs propriétés antinéoplasiques à l'échelle cellulaire, l'identification des effets *in vivo* est compliquée par la difficulté à vérifier l'acheminement des molécules actives à la tumeur. En effet, en ignorant quels sont les molécules actives de la PPPS, il devient particulièrement difficile d'évaluer leur absorption, l'influence du métabolisme sur eux ainsi que leur capacité à franchir la BHE. Ce principe complexifie encore davantage la détermination des cibles pharmacologiques de la PPPS. Par conséquent, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie demeurent nébuleuses.

Malgré ces limitations, certaines expériences supplémentaires devraient être tentées. Puisque l'administration *per os* de PPPS semble inadéquate, d'autres voies d'administration pourraient être envisagées. L'injection intraveineuse serait sûrement la voie parentérale la plus simple. L'administration intrathécale serait également envisageable, bien qu'elle ne soit employée que dans certaines circonstances avec les agents chimiothérapeutiques conventionnels (Muldoon *et al.*, 2007). De surcroît, même lorsque les molécules sont administrées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) avec un courant de convection



continu, les effets obtenus sont souvent décevants, probablement à cause d'une élimination trop rapide et d'une pression interstitielle trop élevée au sein de la tumeur (Zhou *et al.*, 2012). Certains groupes de recherche ont tout de même utilisé cette technique avec succès (Miyake *et al.*, 2009). Par ailleurs, diverses méthodes ont été conçues au cours des dernières années pour tenter de pallier les limitations de la BHE. Ces voies d'administration plus nouvelles incluent la perméabilisation de la BHE ainsi que le recours aux liposomes et aux polymères (Zhou *et al.*, 2012).

Tout d'abord, l'ouverture de la BHE, déjà utilisée en clinique dans les cas de GBM récidivants, permet d'augmenter l'acheminement des agents thérapeutiques au sein de la tumeur et le pronostic des patients présentant une tumeur cérébrale (Fortin *et al.*, 2005). Cette procédure étant déjà caractérisée et employée dans notre laboratoire (Blanchette *et al.*, 2009; Blanchette *et al.*, 2012; Côté *et al.*, 2010), son application dans le contexte de la PPPS serait réalisable.

La nanotechnologie propose également des avenues prometteuses. L'encapsulation de molécules actives dans des nanoparticules et dans des liposomes est de plus en plus utilisée (Swaminathan et Ehrhardt, 2012), notamment en oncologie (Urbinati *et al.*, 2012). Or, la fabrication des liposomes étant une technique bien maîtrisée dans notre laboratoire (Bellavance *et al.*, 2010), l'essai de cette approche en serait facilité. L'insertion de polymères au sein de la cavité de résection tumorale paraît également très intéressante. En effet, cette méthode a déjà démontré une légère augmentation de la survie médiane des patients atteints de GBM (Fadul *et al.*, 2008). Les implants de carmustine dans du poliféprosan 20 (polymère biodégradable), mieux connu sous le nom de Gliadel<sup>®</sup>, sont un exemple de cette technologie (Zhou *et al.*, 2012).

Parallèlement à l'optimisation de la voie d'administration de la PPPS, l'acheminement au sein de la tumeur pourrait être évalué par différentes techniques. Par exemple, dans le modèle de rats Fischer-F98, des molécules choisies pourraient être dosées dans les spécimens tumoraux par spectrométrie de masse, tel que fait antérieurement par d'autres

groupes (Kalt *et al.*, 2008). Pour éviter le sacrifice précoce et excessif des animaux, les molécules ciblées pourraient être dosées dans le LCR par microdialyse (Chefer *et al.*, 2009)

En outre, la recherche de propriétés de sensibilisation s'avère capitale. L'étude de 2013 faite par Jakubowicz-Gil *et al.* ouvre d'ailleurs la voie à l'utilisation de la pelure de pomme ou de ses composantes dans un but de chimiosensibilisation. En effet, la combinaison de quercétine au temozolomide induit davantage d'apoptose que chaque molécule prise séparément (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2013). La nature de cette observation, à savoir s'il s'agit d'effets additifs ou synergiques, n'est toutefois pas mentionnée. La recherche d'une éventuelle radiosensibilisation serait également très pertinente, puisque cette propriété a déjà démontré expérimentalement des bénéfices sur les gliomes malins (Charest *et al.*, 2012; Benayoun *et al.*, 2013).

Plusieurs études tendent à démontrer l'existence de cellules cancéreuses à caractéristiques de cellules souches au sein des GBM (Wen et Kesari, 2008; Nduom *et al.*, 2012; Ricard *et al.*, 2012). Dans ce contexte, les effets de la PPPS sur ces cellules réputées plus agressives mériteraient d'être investigués.

Finalement, étant donné qu'il est presque impossible de reproduire expérimentalement toutes les caractéristiques des tumeurs atteignant les patients, il serait très intéressant de rechercher les effets de la PPPS sur des cultures primaires. D'ailleurs, une banque de ce type de culture provenant de spécimens chirurgicaux est disponible au laboratoire. Ainsi, des tests *in vitro* et *in vivo* pourraient être réalisés éventuellement sur ces populations cellulaires plus hétérogènes.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude sur la PPPS ont non seulement permis de confirmer des effets observés sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses, mais ont également démontré que l'administration *per os* était inadéquate dans le modèle de rats Fischer-F98. Ils ouvrent la porte à de nombreuses perspectives, dans l'espoir d'un jour améliorer le pronostic des patients atteints de GBM.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr David Fortin, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de travailler sur ce projet aussi intéressant que singulier.

Merci également aux Drs Perreault et Cantin d'avoir généreusement accepté de participer à l'évaluation de ce mémoire.

Merci à tous les membres de mon laboratoire, plus particulièrement aux assistants de recherche, Dre Marie-Belle Poirier et Jean-François Jacques, pour leur soutien et pour leurs judicieux conseils. Un merci particulier aussi à Marie Blanchette, pour son grand dévouement, notamment durant mes expériences *in vivo*. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toute l'équipe!

Merci également aux Drs Leonid Volkov et Luc Tremblay pour leur précieuse aide sur le plan technique, ainsi qu'aux laboratoires des Drs Sébire, Perreault et Paquette pour leur aide et le prêt de leur matériel. Merci à l'équipe de la Plateforme d'analyse et de visualisation d'images du Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel d'avoir créé sur mesure un script d'analyse pour mes images IRM.

Merci aux Vergers Leahy, à la Faculté de médecine et des sciences de la santé et à la Banque nationale pour leur soutien financier. Merci à la compagnie AppleBoost<sup>TM</sup> pour leur généreux don de PPPS.

Merci à la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke de m'avoir permis de faire partie du programme conjoint M.D.-M.Sc. Finalement, merci à ma famille et à mes proches. Sans leur soutien inconditionnel et leur écoute, la réalisation de ce double programme n'aurait sûrement pas été possible.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aggarwal BB, Shishodia S (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71:1397–421
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Al. E (2002) Isolating Cells and Growing Them in Culture. In: Science G (ed) *Molecular Biology of the Cell*, 4e édition. New York
- Arcella A, Biagioni F, Antonietta Oliva M, Bucci D, Frati A, Esposito V, Cantore G, Giangaspero F, Fornai F (2013) Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. *Brain Res* 1495:37–51
- Babeu J-P, Darsigny M, Lussier CR, Boudreau F (2009) Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G124–34
- Barnes S, Prasain J, D'Alessandro T, Arabshahi A, Botting N, Lila MA, Jackson G, Janle EM, Weaver CM (2011) The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food Funct* 2:235–44
- Béliveau R, Gingras D (2005) Les aliments contre le cancer : La prévention et le traitement du cancer par l'alimentation (É du Trécaré, Ed.). Outremont, Québec, 218 p.
- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Meir EG Van (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1046–1069
- Bellavance M-A, Poirier M-B, Fortin D (2010) Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells. *Int J Pharm* 395:251–9
- Benayoun L, Schaffer M, Bril R, Gingis-Velitski S, Segal E, Nevelsky A, Satchi-Fainaro R, Shaked Y (2013) Porfimer-sodium (Photofrin-II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy. *Cancer Biol Ther* 14:64–74
- Berridge M V, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*:14–19
- Blanchette M, Michaud K, Fortin D (2012) A new method of quantitatively assessing the opening of the blood-brain barrier in murine animal models. *J Neurosci Methods* 207:125–9

- Blanchette M, Pellerin M, Tremblay L, Lepage M, Fortin D (2009) Real-time monitoring of gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid during osmotic blood-brain barrier disruption using magnetic resonance imaging in normal wistar rats. *Neurosurgery* 65:344–51
- Boya P, Gonza R, Casares N, Perfettini J, Dessen P, Larochette N, Me D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Mol Cell Biol* 25:1025–1040
- Boyer J, Liu RH (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3:1–15
- Braganhof E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku ASK, Wink MR, Salbego C, Battastini AMO (2006) Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 17:663–71
- Brown AP, Dinger N, Levine BS (2000) Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 39:17–21
- Cagnol S, Chambard J-C (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277:2–21
- Comité directeur de la Société canadienne du cancer : *Statistiques canadiennes sur le cancer 2012*. Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2012
- Charest G, Sanche L, Fortin D, Mathieu D, Paquette B (2012) Glioblastoma treatment: bypassing the toxicity of platinum compounds by using liposomal formulation and increasing treatment efficiency with concomitant radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84:244–9
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS (2009) Overview of Brain Microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* 47:1–35
- Chiu W-T, Shen S-C, Chow J-M, Lin C-W, Shia L-T, Chen Y-C (2010) Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. *Neurobiol Dis* 37:118–29
- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis AM, Fortin D, Lepage M, Gobeil FJ (2010) Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides* 44:177–85
- DeAngelis LM (2001) Brain Tumors. *N Engl J Med* 344:114–123
- Delbridge ARD, Valente LJ, Strasser A (2012) The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4

- Ding M, Lu Y, Bowman L, Huang C, Leonard S, Wang L, Vallyathan V, Castranova V, Shi X (2004) Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract. *J Biol Chem* 279:10670–6
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5:v1–v49
- Eberhardt M V, Lee CY, Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903–904
- Escarpa a, González MC (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A* 823:331–7
- Fadul CE, Wen PY, Kim L, Olson JJ (2008) Cytotoxic chemotherapeutic management of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 89:339–57
- Fan Q-W, Weiss W a. (2011) Autophagy and Akt promote survival in glioma. *Autophagy* 7:536–538
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud P-O, Romero I, Weksler B, Freitas V de, Mateus N, Calhau C (2011) Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct* 2:39–44
- Fortin D, Desjardins A, Benko A, Niyonsega T, Boudrias M (2005) Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience. *Cancer* 103:2606–15
- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart L a (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4:309–24
- Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Kreisberg JJ, Ballman K, Boni J, Peralba JM, Jenkins RB, Dakhil SR, Morton RF, Jaeckle K a, Scheithauer BW, Dancey J, Hidalgo M, Walsh DJ (2005) Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 23:5294–5304
- Gallus S, Talamini R, Giacosa A, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S, Negri E, Vecchia C La (2005) Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann Oncol* 16:1841–1844
- Gerhauser C (2008) Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* 74:1608–24

- Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, Raul F (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26:1291–5
- He X, Wang Y, Hu H, Zhang Z (2012) In vitro and in vivo antimammary tumor activities and mechanisms of the apple total triterpenoids. *J Agric Food Chem* 60:9430–9436
- Hegi ME, Rajakannu P, Weller M (2012) Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 25:774–9
- Hyson DA (2011) A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship. *Adv Nutr* 2:408–420
- Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y (2005) Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int J Oncol* 26:1401–1410
- Jakubowicz-Gil J, Langner E, Bądziul D, Wertel I, Rzeski W (2013) Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumour Biol*
- Ju Z, Yuan Y, Liu C, Zhan S, Wang M (1996) Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. *Postharvest Biol Technol* 8:83–93
- Kahle K, Huemmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T, Richling E (2007) Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J Agric Food Chem* 55:10605–14
- Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore S a E, Graf B a, O’Leary JM, Milbury PE (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem* 56:705–12
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11:448–457
- Karim R, Kanazawa T, Daigaku Y, Fujimura S, Miotto G, Kadowaki M (2007) Cytosolic LC3 Ratio as a Sensitive Index of Macroautophagy in Isolated Rat Hepatocytes and H4-II-E Cells. *Autophagy* 3:553–560
- Kaza N, Kohli L, Roth KA (2012) Autophagy in Brain Tumors : A New Target for Therapeutic Intervention. *Brain Pathol* 22:89–98

- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 49:317–28
- Kim EJ, Choi CH, Park JY, Kang SK, Kim YK (2008) Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. *Neurochem Res* 33:971–9
- Kim M-S, Kwon JY, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ (2009) Phloretin induces apoptosis in H-Ras MCF10A human breast tumor cells through the activation of p53 via JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1171:479–83
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76:560–8
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5:726–34
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2005) Robbins and Cotran - Pathologic Basis of Disease, 7e edn. Elsevier Saunders, Philadelphia
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27–42
- Li Y, Fan L, Sun Y, Zhang D, Yue Z, Niu Y, Meng J, Yang T, Liu W, Mei Q (2013) An apple oligogalactan suppresses endotoxin-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibition of LPS pathways. *Int J Biol Macromol* 61:75–81
- Li Q, Zhou S, Jing J, Yang T, Duan S, Wang Z, Mei Q, Liu L (2013) Oligosaccharide from apple induces apoptosis and cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells. *Int J Biol Macromol* 57C:245–254
- Liu J-R, Dong H-W, Chen B-Q, Zhao P, Liu RH (2009) Fresh apples suppress mammary carcinogenesis and proliferative activity and induce apoptosis in mammary tumors of the Sprague-Dawley rat. *J Agric Food Chem* 57:297–304
- Liu L, Li YH, Niu YB, Sun Y, Guo ZJ, Li Q, Li C, Feng J, Cao SS, Mei QB (2010) An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis* 31:1822–32
- Liu RH, Liu J, Chen B (2005) Apples prevent mammary tumors in rats. *J Agric Food Chem* 53:2341–3
- Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T, Brodie C (2009) The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer* 125:717–722



- Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 1:97–117
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109
- Maldonado-Celis M-E, Bousserouel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F (2009) Differential Induction of Apoptosis by Apple Procyanidins in TRAIL-Sensitive Human Colon Tumor Cells and Derived TRAIL-Resistant Metastatic Cells. *J Cancer Mol* 5:21–30
- Maldonado-Celis ME, Roussia S, Foltzer-Jourdainne C, Gossé F, Lobstein A, Habold C, Roessner A, Schneider-Stock R, Raul F (2008) Modulation by polyamines of apoptotic pathways triggered by procyanidins in human metastatic SW620 cells. *Cell Mol life Sci* 65:1425–34
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230S–242S
- Mathieu D, Lecomte R, Tsanaclis AM, Larouche A, Fortin D (2007) Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci* 34:296–306
- McGhie TK, Hunt M, Barnett LE (2005) Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *J Agric Food Chem* 53:3065–70
- Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release* 164:192–204
- Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R (2012) Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res* 318:925–35
- Miura T, Chiba M, Kasai K, Nozaka H, Nakamura T, Shoji T, Kanda T, Ohtake Y, Sato T (2008) Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis* 29:585–93
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2007) Effect of Apple Polyphenol Extract on Hepatoma Proliferation and Invasion in Culture and on Tumor Growth, Metastasis, and Abnormal Lipoprotein Profiles in Hepatoma-Bearing Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:2743–2750

- Miyake JA, Benadiba M, Colquhoun A (2009) Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression. *Lipids Health Dis* 8:1–10
- Moore MN (2008) Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 4:254–256
- Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC (2010) Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 22:206–211
- Muldoon LL, Soussain C, Jahnke K, Johanson C, Siegal T, Smith QR, Hall W a, Hynynen K, Senter PD, Peereboom DM, Neuwelt E a (2007) Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol* 25:2295–305
- Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, Takaku A, Endo S, Kumanishi T (2002) Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. *J Neurosurg* 96:909–917
- Nduom E, Hadjipanayis C, VanMeir E (2012) Glioblastoma Cancer Stem-like Cells - Implications for Pathogenesis and Treatment. *Cancer J* 18:100–106
- Nogueira L, Ruiz-ontañón P, Vazquez-barquero A, Fernandez-luna JL (2011) The NFκB pathway : a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget* 2:646–653
- Pardridge WM (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1:131–9
- Pedersen P, Marienhagen K, Mørk S, Bjerkvig R (1993) Migratory Pattern of Fetal Rat Brain Cells and Human Glioma Cells in the Adult Rat Brain. *Cancer Res* 53:5158–5165
- Pierini R, Kroon P a, Guyot S, Ivory K, Johnson IT, Belshaw NJ (2008) Procyanidin effects on oesophageal adenocarcinoma cells strongly depend on flavan-3-ol degree of polymerization. *Mol Nutr Food Res* 52:1399–407
- Psahoulia FH, Moumtzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A (2007) Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. *Carcinogenesis* 28:1021–31
- Reagan-Shaw S, Eggert D, Mukhtar H, Ahmad N (2010) Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells. *Nutr Cancer* 62:517–24
- Ricard D, Idbah A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre J-Y (2012) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 379:1984–96

- Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1:1458–1461
- Rietze RL, Reynolds B a (2006) Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 419:3–23
- Roche Cell Proliferation Reagent WST-1. Roche 1:87–88
- Rogers LR (2012) Neurologic complications of radiation. *Contin Lifelong Learn Neurol* 18:343–54
- Rosa FA La, Pierce JW, Sonenshein GE (1994) Differential Regulation of the c-myc Oncogene Promoter by the NF-KB Rel Family of Transcription Factors. *Mol Cell Biol* 14:1039–1044
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ (2007) Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 6:304–312
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003) Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65:1035–1041
- Schneider SW, Ludwig T, Tatenhorst L, Braune S, Oberleithner H, Senner V, Paulus W (2004) Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol* 107:272–6
- See S-J, Gilbert MR (2007) Chemotherapy in adults with gliomas. *Ann Acad Med Singapore* 36:364–6
- Shoji T, Akazome Y, Kanda T, Ikeda M (2004) The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food Chem Toxicol* 42:959–67
- Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Akiyama H, Kanda T, Ohtake Y, Goda Y (2006) Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 54:884–92
- Stummer W, Bent MJ van den, Westphal M (2011) Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien)* 153:1211–8
- Stupp R, Mason WP, Bent MJ van den, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes A a, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–96

- Sun J, Chu Y-F, Wu X, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50:7449–54
- Sun J, Liu RH (2008) Apple Phytochemical Extracts Inhibit Proliferation of Human Breast Cancer Cells through Cell Cycle Modulation. *J Agric Food Chem* 56:11661–11667
- Swaminathan J, Ehrhardt C (2012) Liposomal delivery of proteins and peptides. *Expert Opin Drug Deliv* 9:1489–1503
- Tanida I, Waguri S (2010) Measurement of Autophagy in Cells and Tissues (P Bross and N Gregersen, Eds.). *Methods Mol Biol* 648:193–214
- Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I (2002) p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1:493–503
- Thompson MD, Stushnoff C, McGinley JN, Thompson HJ (2009) In vitro measures used to predict anticancer activity of apple cultivars and their comparison to outcomes from a rat model of experimentally induced breast cancer. *Nutr Cancer* 61:510–7
- Ueno M, Nakagawa T, Wu B, Onodera M, Huang C-L, Kusaka T, Araki N, Sakamoto H (2010) Transporters in the brain endothelial barrier. *Curr Med Chem* 17:1125–38
- Urbinati G, Marsaud V, Renoir J (2012) Anticancer drugs in liposomal nanodevices: a target delivery for a targeted therapy. *Curr Top Med Chem* 12:1693–1712
- Veeriah S, Hofmann T, Glei M, Dietrich H, Will F, Schreier P, Knaup B, Pool-Zobel BL (2007) Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J Agric Food Chem* 55:2892–900
- Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 45:164–74
- Vehlow A, Cordes N (2013) Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta* 1836:236–44
- Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36:829–37
- Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A (2003) The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* 20:65–72
- Wen PY, Kesari S (2008) Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 259:492–507

- Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51:609–14
- Yoon H, Liu RH (2007) Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF-kappaB activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem* 55:3167–73
- Yoon H, Liu RH (2008) Effect of 2alpha-Hydroxyursolic Acid on NF-KB Activation Induced by TNF-alpha in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Agric Food Chem* 56:8412–8417
- Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T (1992) Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 52:6676–81
- Zhang D, Li Y-H, Mi M, Jiang F-L, Yue Z-G, Sun Y, Fan L, Meng J, Zhang X, Liu L, Mei Q-B (2013) Modified apple polysaccharides suppress the migration and invasion of colorectal cancer cells induced by lipopolysaccharide. *Nutr Res* 33:839–48
- Zheng C-Q, Qiao B, Wang M, Tao Q (2013) Mechanisms of apple polyphenols-induced proliferation inhibiting and apoptosis in a metastatic oral adenoid cystic carcinoma cell line. *Kaohsiung J Med Sci* 29:239–45
- Zhou J, Atsina K-B, Himes BT, Strohbehn GW, Saltzman WM (2012) Novel Delivery Strategies for Glioblastoma. *Cancer J* 18:89–99

